

学位論文

ラット新生児皮膚における再上皮化過程の形態学的解析

(Morphological analyses of the reepithelialization process in
neonatal rat skin)

新井 美存

Miari Arai

2014

目次

第一章	序論	1
第二章	ラット新生児皮膚切創の再上皮化過程における表皮の厚さの変動	
	要旨	4
	序論	5
	材料と方法	8
	結果	10
	考察	14
	付図	
第三章	真皮非依存的な表皮の潜在能力による微小創の創閉鎖	
	要旨	30
	序論	31
	材料と方法	33
	結果	35
	考察	39
	付図	
第四章	総合考察	56
	謝辞	60
	引用文献	61
	和文摘要	69
	英文摘要	71
	学術論文の基礎となる学会誌公表論文	74

第一章

序論

傷が治るというのは、生物特有の現象である。無生物には自己修復能力はなく、これは生物を定義する特徴の一つと言える。自己修復能力の規模は生物種によって大きく異なり、同じ多細胞生物でも、プラナリアのように体の半分以上を失っても再生できるものもあれば、我々ヒトのように比較的小さな損傷の修復である創傷治癒しかできないものもある。しかし、上皮のわずかな傷でも体外からの微生物の侵襲や体液の損失を生じするため、修復されなければ生命は脅かされる (Clark, 2001 ; Clark *et al.*, 2007)。程度の差はあれども、自己修復は生物の個体生存のために必須の能力なのである。

生物の最外層に位置する皮膚は体内と体外を隔てる境界であり、損傷すると体内環境の恒常性が崩壊し、個体の死を招く (Koster and Roop, 2007; Proksch *et al.*, 2008)。ゆえに早急に修復しなければならず、創傷治癒過程における再上皮化は、生物が生きていくために必要不可欠な自己修復である。

皮膚は、体表を覆う多層化した上皮である表皮と、それを内側から支える結合組織である真皮から構成される。哺乳類の成体で皮膚に傷ができると、創部はまず血液凝固反応によって形成されたフィブリンクロットによって塞がれ、炎症反応が起こる。それから、創縁から這い出してきた表皮によって創閉鎖が始まり、真皮が再構築されていく

(Martin and Parkhurst, 2004)。皮膚の傷が修復された後、しばしば傷跡（瘢痕）が残され、失われた汗腺や毛包といった皮膚付属器は再生されない。これらの問題は真皮で起こる事象であるため、皮膚創傷治癒研究の多くは真皮に関するものである。

では、表皮の再生のメカニズムはどのようなものなのか。表皮は皮膚のバリア機能を果たしていて、最外層で複数の細胞間接着により水をも通さない構造をつくり、外界と体内を区切っている (Proksch *et al.*, 2008)。表皮は、分化段階によって性質が異なる4種の細胞が層を形成している。最下層の基底細胞層で分裂した表皮ケラチノサイトは、形態や性質を変化させながら有棘細胞層、顆粒細胞層を経て細胞小器官を失った角質層へと終末分化し、体表へと押し出されていく。皮膚が傷つくと再上皮化が起こり、表皮ケラチノサイトは創周囲表皮から欠損に動員され、傷の両端から真皮の創縁、創床に沿って中央まで移動し、創部は再び表皮によって覆われる。先行研究から、新生児期ラッ

トでは、創部は創周囲の表皮の急速な伸展によって覆われ、創縁表皮のケラチンやカドヘリンの発現パターンが変化することが明らかにされている (Koizumi *et al.*, 2004 ; 2005)。

しかし、創閉鎖はある意味で再上皮化の一素過程にすぎず、表皮の再生の全貌はいまだ明らかになっていない。特に、*in vivo*における再上皮化の研究は少なく、形態学的、細胞学的観点から解決すべき事象が多く残されたままである。創傷治癒は多くの異なる細胞型や組織の協調した複雑な過程であるにもかかわらず、*in vitro*の簡素化された実験系で、特定の細胞や分子のみに注目した研究が多いのが実状である。

そこで、本研究で著者は創傷治癒過程における再上皮化に焦点を当てた。著者はまず、創閉鎖後の創部表皮がどのようにして正常状態へ回復していくのかに興味を持った。まだ創部の真皮が再構築途上にある中、開放面を覆った表皮がどうなるのかはあまり調べられておらず、よくわかっていない。第二章では、新生児ラットにおける創閉鎖後の表皮の形態変化に着目し、その原因を探った。

新生児ラット背部皮膚に切創を施すと、傷つけ後 48 時間までに創閉鎖は完了し、創部表皮はそれから一度真皮側へ落ち込み肥厚した後、薄化していき正常時の厚さに回復することがわかった。著者は、この創部を被覆した表皮の厚さの変動の原因を明らかにするために、細胞増殖、アポトーシス、細胞分化の 3 点の変化に注目した。免疫組織化学的手法を用いて解析したところ、肥厚時の創部表皮では有棘層上部から顆粒層に相当する表皮ケラチノサイトの終末分化に遅延、または乱れが生じていること、逆に、薄化時には顆粒層で角質化が亢進していることが示唆された。

次に、第三章では創閉鎖における表皮の移動について、細胞移動を司るアクトミオシン細胞骨格系や Rho ファミリー small GTPases に注目して解析した。創閉鎖では、表皮細胞は互いに接着を保った多層のシート構造を保ったまま創部中央へ移動する。できる限り純粋な表皮の振る舞いを解析するために、まずは真皮の影響を極力抑えた傷つけ方法の確立を目指した。電動ヤスリによる擦過傷やテープストリッピング、熱傷等、様々な傷つけ方法を試したが、一定した傷つけができること、創縁が明確であること、解析のしやすさなどから、最終的に緑内障ナイフを用いた浅い切創の実験系を確立した。この方法では、メスの刃先 200 μm のところに付けられたストッパーによって、新生児ラット皮膚の表皮および真皮の上部 3 分の 1 までの浅い切創（本研究では以下、これを微小創と称する）を施すことができた。

微小創は傷つけ後 12 時間までに創縁表皮によって創閉鎖するものの、直下の真皮で

は間隙が残された。さらに、創閉鎖中の創縁表皮では細胞運動の関与を示す活性型ミオシン軽鎖（p-MLC）が検出され、これら細胞運動に関わるシグナル伝達経路を阻害すると創閉鎖しなかった。以上の結果から、創閉鎖は細胞間接着を保ったままアクトミオシン細胞骨格系が活性化された表皮ケラチノサイトの協調性ある移動によって行われることがわかった。さらに、このことが殆ど表皮だけに施した創傷モデルにおける創閉鎖過程で示されたことは、皮膚創傷治癒の一素過程である表皮創閉鎖が、真皮に依存することなく、表皮だけで完結し得る過程であることを強く示唆する結果となった。

in vivo 実験系を用いて、新生児皮膚の再上皮化を形態学的に解析した本研究は、再上皮化過程における表皮組織のダイナミックな形態変化が、個々の表皮ケラチノサイトの性質の変化によって引き起こされていることを明らかにした。そして、皮膚創傷治癒における表皮の動態について新しい見解を示した。

正常時には制御された増殖と分化、細胞間接着によって整然とした層構造を維持している表皮は、受創によって細胞間や真皮との結合を失うと、創縁の表皮ケラチノサイトは数時間以内に分化段階や接着を変化させて、創部を被覆するために移動を開始する。このとき、生体皮膚でも *in vitro* と同様に、細胞間接着を維持したまま個々の細胞でアクトミオシン系が活性化することによってシート状態を保って移動することを免疫組織染色像で明らかにした。それから、創部表皮は創閉鎖後に一度肥厚した後、薄化して正常状態へ回復する。この創部表皮の厚さが変動する期間には、表皮ケラチノサイトの形質や終末分化の速度に変化が生じていることを示した。創閉鎖後の表皮の厚さの変化に着目した研究は他にはみられず、本研究の果たした役割は大きい。

第二章

ラット新生児皮膚切創の再上皮化過程における 表皮の厚さの変動

要旨

皮膚の傷において、創閉鎖後に表皮の厚さが変動する機構を明らかにするため、生後 1 日齢ラット新生児の背部皮膚に全層切創を施した。創部を被覆した表皮の厚さは傷つけ後 96 時間前後で最大値に達し、その後薄化していった。まず、創部の表皮において細胞増殖とアポトーシスについて解析したところ、TUNEL 陽性細胞の割合から、肥厚した表皮が薄化し始めている傷つけ後 120 時間でアポトーシスが増加することが明らかになった。続いて、表皮ケラチノサイトの分化マーカーである *loricrin*, *involucrin*, *filaggrin* を免疫組織染色したところ、最も肥厚した状態から薄化へ転換する時期の創部表皮の有棘層から顆粒層にわたる領域では、終末分化の遅延、あるいは抑止が起きていることが示唆され、これが創部表皮の肥厚の原因である可能性が高まった。そして、創部表皮が肥厚している傷つけ後 96 時間では、抗 *caspase 14* 抗体で染色されない領域が表皮下部で広く観察されたが、一転して、薄化し始めた傷つけ後 120 時間では同抗体の染色範囲がより表皮下層まで拡大し、染色強度も増加した。このことは、肥厚期には角質化が遅延し、薄化期に転換する時には角質化が亢進することを示す。以上の結果から、表皮ケラチノサイトの終末分化および角質化の遅延と加速の調和が、新生児ラットの創部表皮の厚さが変動する一要因であると結論づけた。

序論

生物学的に見ると、創傷治癒過程における再上皮化は生物が生きていくために必須の事象である。再上皮化過程において、創部及び創周囲では多くの性質が異なる細胞や組織が動員され、それぞれが複雑に絡み合いながら作用することが知られているが、その仕組みには未だ解明されていない部分が多い。

皮膚は、体表を覆う多層化した上皮である表皮と、それを内側から支える結合組織である真皮から成る。そのうち、表皮は、分化段階によって性質が異なる4種類の細胞に分類され、層構造を形成している。(Fuchs and Horsley, 2008)。基底層で分裂した細胞は、終末分化の過程を経て皮膚表面の角質層へ押し出されていく。それぞれの層の細胞は、複数の表皮ケラチノサイト分化マーカーを用いて免疫組織染色によって染め分けることができる。

ケラチンは、表皮細胞では量的に最も多く、上皮特異的中間径線維であるケラチン線維をつくるタンパク質である。皮膚の多様なケラチンは層によって発現している組み合わせが異なり (Fuchs, 1995)、正常皮膚ではケラチン 14 (K14) は未分化な基底層、ケラチン 10 (K10) は分化した有棘層で発現し、ケラチン 6 (K6) は癒傷時に一時的に有棘層で発現することが知られている。また、involucrin や filaggrin, loricrin は終末分化の後期に行われる角質の形成に関与するタンパク質であり、正常皮膚では、profilaggrin/filaggrin と loricrin は顆粒層から上層で発現し、involucrin は有棘層上部から上層で発現することが知られている (Byrne *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Presland *et al.*, 2001; Denecker *et al.*, 2008)。

表皮の終末分化は、未分化な基底細胞が基底膜から離れて suprabasal cell へ分化し、形や性質を変化させながら最終的に角質化して剥離する過程である。CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP- α) は細胞分化に関与する転写因子であり、細胞の増殖を抑制する働きをして、基底細胞を分化へ傾倒させて有棘細胞へスイッチさせる役割を担う (Johnson, 2005; Maytin *et al.*, 1999)。この C/EBP- α は involucrin の発現の上昇に関与することも知られていて (Agarwal *et al.*, 1999; Eckert *et al.*, 2004)、正常な表皮では基底層から発現し始め (Oh and Smart., 1998)、終末分化の進行とともに発現が増し、顆粒層で最も高くなる。一方、caspase-14 は、皮膚では終末分化の過程にある表皮や毛包のみで発現することが知られているタンパク質分解酵素であり (Van de Crean *et al.*, 1998; Lippens *et al.*, 2000; Alibardi *et al.*, 2005)、表皮

では角質層下部で filaggrin をアミノ酸に分解する役割を担い (Denecker *et al.*, 2008; Hoste *et al.*, 2011; Eckhart and Tschachler, 2011), 正常な表皮では有棘層から上層で発現がみられ, 基底層では発現しない。さらに, 表皮ケラチノサイトの細胞死の様式は厳密にコントロールされていることが知られていて (Rendl *et al.*, 2002), 核の消失などアポトーシスによく似た仕組みが関与していることも示唆されている (Lippens *et al.*, 2005; Rendl *et al.*, 2002)。

皮膚が傷つくと, 再上皮化が起こり, 表皮細胞は創周囲表皮から創部に動員され, 傷の両端から真皮の創縁, 創床に沿って中央まで移動し, 創部は再び表皮によって覆われる。創傷治癒の様式は個体発生の段階によって異なることが知られていて, 哺乳類の成体では, 皮膚に傷ができると, まずフィブリンクロットによって塞がれ, その後遅れて創縁から這い出してきた表皮によって創閉鎖が行われる (Martin and Parkhurst, 2004)。一方, 新生児期ラットでは, 皮膚が傷つけられると, 創周囲の表皮細胞が急速に伸展して開放面を覆うことが知られている。創部の免疫組織化学的解析によって, 全層欠損創の創縁表皮における正常状態と異なるケラチンやカドヘリンの発現パターンが明らかにされている (Koizumi *et al.*, 2004 ; 2005)。

しかし, 再上皮化の後半期の過程については未だよくわかっていない。傷は, 創周囲から這い出してきた表皮シートによって塞がれて創閉鎖に至った後, どのような過程を経るのであろうか。そして, 創傷治癒における上記のような表皮の異常状態は, いつ, どのように終息し, 再び正常状態を回復するのであろうか。本研究では新生児ラットの背部皮膚に切創を施し, その治癒過程における表皮の形態学的変化を解析した。全層欠損創の創閉鎖に要する時間は創部の面積に依存し, 創部が小さい切創では, 比較的短時間で創閉鎖に至ると考えられ, 創閉鎖の終息段階の解析に有利であることが期待されたためである。新生児ラットの背部皮膚に切創を施すと, まず創縁表皮がシートの状態を保ったまま這い出し, 創部を被覆した。その後, 創部を塞いだ表皮は一度真皮の方向へ肥厚してから薄化するという過程を経て, 正常状態を回復した。この, 創閉鎖後に創部の表皮の厚さが変動する現象に着目し, その原因を究明することを本研究の基軸とした。

まず, 創部表皮を構成する細胞数の変化に注目し, 細胞の増殖を抗 BrdU 抗体染色で, アポトーシスを TUNEL で検出し, 創部表皮全細胞に含まれるそれぞれの陽性細胞の割合を算出した。次に, 表皮ケラチノサイトの終末分化に注目し, 創閉鎖後の創部表皮の分化段階を明らかにするため, 表皮分化マーカーとして involucrin, profilaggrin/filaggrin, lorierin の抗体を用いて隣接切片の免疫組織染色を行った。続いて, 創部表皮のケラチノサイトでは終末分化のどの段階で変化が起きているのかを検証するために, 終末分化の初期に関与する C/EBP- α と後期に働く caspase-14 の分布を,

免疫組織化学的手法を用いて解析した。本研究から、肥厚した創部表皮では、有棘層上部から顆粒層に位置する表皮ケラチノサイトの終末分化に遅延、または乱れが生じていること、一方で創部表皮が薄くなる時には、表皮上層で TUNEL 陽性細胞の割合が上昇し、顆粒層では角質化の亢進が起きていることが示唆された。

材料と方法

傷つけ、および創部、正常部の定義

生後 1 日目の新生児 Sprague-Dawley ラット（母親は清水実験材料より購入）に氷中で低温麻酔をかけ、背部皮膚に Disposable Scalpels NO.11 (Feather) を用いて正中線と平行な長さ 3mm、深さ 1mm の切創を、正中線を挟んで左右一対ずつ施した。創部の化膿や感染症を予防するために傷の上からオプサイト (Smith & Nephew) を巻いた後、新生児を母親ラットのもとへ戻した。

本研究では、創縁間の創部表皮領域、および創縁から 5mm 以上離れた領域の正常な毛包間表皮をそれぞれ創部、正常部と定義した。

BrdU 投与

採皮 2 時間前に 10 μ l/gram (体重) の 10mM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を各個体の腹腔に注射し、核内に取り込ませた。

組織染色と免疫組織染色

創部皮膚は、傷つけ後 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 時間に、新生児ラットを氷中で安楽死させ、創部を中心に背部皮膚を採取した。皮膚片は、4%paraformaldehyde in PBS(-) で 1 時間固定した後、パラフィン包埋した。厚さ 4 μ m の切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン (HE) 染色または免疫組織染色を行った。免疫組織染色では、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) や 1 mM EDTA (pH 8.0) 等で適宜賦活化を行った後、1% normal horse serum を室温で 20 分間反応させ、抗体の非特異的結合をブロッキングした。一次抗体は 4℃で overnight 反応させ、二次抗体は室温で 2 時間反応させた。その後、0.1 μ g/ml の 4', 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Polysciences) で核染色し、観察した。

以下に使用した抗体を示す。一次抗体：mouse anti-cytokeratin 14 monoclonal antibody(mAb) (Chemicon, 1:100)；mouse anti-cytokeratin 10/13 mAb(Lab Vision, 1:100)；mouse anti-cytokeratin 6 mAb (Progen, 1:50)；rabbit anti-mouse involucrin poriclonal antibody (pAb) (Berkley antibody company, 1:500)；rabbit anti-mouse

loricrin pAb (abcam, 1:500) ; rabbit anti-rat profilaggrin/filaggrin pAb (466) (generously supplied by Dr. R. B. Presland, 1:250) ; mouse anti-BrdU mAb (Dako Cytomation, 1:100)。二次抗体 ; Alexa fluor 594 goat anti-mouse IgG₁ (Molecular Probes, 1:1500) ; Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG_{2a} (Molecular Probes, 1:500) ; Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG₁ (Molecular Probes, 1:500) ; Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1:500)。

loricrin と involucrin および involucrin と filaggrin の二重染色, 抗 C/EBP- α , 抗 caspase 14 抗体染色には酵素抗体法を用いた。クエン酸緩衝液(pH 6.0)もしくは 10% TritonX-100 in PBS(-)で処理した後, ブロッキングの前に H₂O₂ によって内在性 peroxidase を失活させた。抗体反応に続く発色反応後, ヘマトキシリンで核染色をおこなった。

以下に使用した抗体を示す。一次抗体 : anti-C/EBP- α rabbit pAb (Santa Cruz, 1:100) ; anti-caspase 14 rabbit pAb (IMGEX, 1:1000)。二次抗体 : HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulins (DakoCytomation, 1:100) ; alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit immunoglobulins (sigma-aldrich, 1:100)。

TUNEL

TUNEL 染色は *In situ cell death detection kit* and TMR red (Roche Diagnostics)を用いた。

BrdU および TUNEL 陽性細胞の割合の数的処理

創部ならびに正常部表皮における, DAPI 陽性細胞数に占める BrdU および TUNEL 陽性細胞数の割合を算出した。

結果

切創の形態変化

傷つけ直後 (0hPW) の HE 染色像をみると、本実験で施した深さ 1mm の切創は、表皮と基底膜、真皮を切断していることがわかる (図 1A)

HE 染色像より、切創は、傷つけ後 48 時間以内に、創縁から伸展してきた表皮のシートが創部中央でぶつかることによって塞がれた (図 1B)。このとき、切創を塞いだ表皮シートの細胞を含め、創周囲の表皮細胞においてもケラチン 10 (K10)、K14 の発現パターンに変化が見られた。正常表皮では基底層でのみ発現する K14 が創部ではより apical 側の細胞でも発現し、有棘層以上で発現する K10 は弱まった (図 1G, H, M, N)。また、正常な表皮細胞では発現せず (図 1S)、乾癬や創傷治癒など表皮細胞増殖亢進時の有棘層で特異的に発現する K6 も、切創を塞いだ表皮シート及び創周囲の表皮細胞では、傷つけ後 24 時間から引き続き発現がみられた (図 1T)。このとき、最下層 1 層の細胞では K6 の発現がみられなかったことから、この 1 層の細胞は基底細胞様であることがわかる。

傷つけ後 72-120 時間が表皮の厚さのピークである (図 1C-E)。肥厚した創部表皮は、まだ角質層以下のほぼ全細胞層で K14 陽性であるが (図 1I-K)、創周囲の細胞の K14 発現や表皮全体の K10 の発現は正常状態に回復してきている (図 1O-Q)。また、K6 の発現は更に創部に限定された (図 1U-W)。

その後、3 種のケラチンの発現は時間経過とともに正常状態に回復していった (図 1L, R, X)。創部の表皮細胞がもとの性質を取り戻していくのと同時に、創部の表皮の位置は apical 側へ持ち上がっていき、厚さも薄くなっていった (図 1F)。そして、傷つけ後 192 時間では、表皮の厚さと性質はほぼ正常状態を回復した (未発表)。

傷を塞いで肥厚した表皮が薄くなる過程の解析

前述の組織染色の結果から、創閉鎖を終えた表皮の厚さが変動していることがわかった。創部を被覆した表皮は一度真皮側へ肥厚し、その後薄化して定常時の厚さに回復した。では、創部表皮の厚さが変動する要因は何であろうか。

まず、表皮細胞数が変化しているのではないかと考えた。事実、創部表皮の肥厚時は薄いときと比較して細胞数が多かった。細胞数が増減する要因として、細胞増殖と細胞

死を考えた。肥厚期には、細胞増殖が促進されて新しい細胞が供給され、細胞死は抑制されるのではないか。逆に、薄化期には、細胞増殖が抑制されて新しい細胞が供給されないために既存細胞の角化に伴って次第に細胞数が減少し、さらに細胞死が活発に起こり積極的に細胞数を減らすのではないかと推察した。そこで、傷つけするしないにかかわらず、採皮の2時間前に10mM BrdUを投与し、採皮までに取り込まれたBrdUを抗BrdU抗体及び蛍光標識二次抗体で検出し、増殖細胞を染色した。傷つけ直後(0hPW)の採皮では、基底層でBrdU陽性細胞がみられた(図2A)。傷つけ後48時間でも、切片によっては傷を塞いだ表皮シートでもいくらかBrdU陽性細胞がみられた(図2B)。創部表皮が最も肥厚している傷つけ後96時間では、最下層第一層のみならず、よりapical側でもBrdU陽性細胞が観察された切片もあった(図2D)。創領域内のBrdU陽性ケラチノサイトの絶対数に着目すると、肥厚時には多く、薄い時は少ない。このことから、創閉鎖した表皮が肥厚する過程には、細胞増殖が関与していることが推測された。しかし、傷つけ直後から144時間までの間では、創部表皮細胞数に対する陽性細胞数の割合には大きな変化はみられなかった(図2G, H)。以上の結果から、細胞増殖が抑制されたために創部表皮が薄化しているとは言えなかった。

次に、創部表皮が薄くなるために細胞数を減らす際、能動的な細胞死であるアポトーシスが誘導されている可能性を考えた。傷つけ後48時間から96時間では、創部表皮におけるTUNEL陽性細胞数の割合は傷つけ直後や正常域の表皮とほぼ同程度の値を示した(図2I-L, O, P)。しかし、傷つけ後120時間の創部表皮では、陽性細胞数の割合が正常域や傷つけ直後の値と比較して有意に増加した(図2M, O; 赤色**, P)。傷つけ後144時間の創部でも、まだ正常域と比較してTUNEL陽性細胞数の割合が高いが(図2N, O; 赤色*, P)、傷つけ後192時間では、創部、正常域ともに陽性細胞数の割合が他の時間と比較して2分の1近くまで減少した(未発表)。また、表皮におけるTUNEL陽性細胞は、正常域、創部ともに顆粒層の核を保有している上限部付近でのみ観察された。以上の結果から、肥厚した創部表皮が薄化するときには、細胞死、特に表皮細胞が顆粒層から角質層へ移行する時の角質化が関与している可能性が示唆された。

創部表皮細胞の分化速度が変動している可能性

続いて、創閉鎖後の創部表皮において、表皮ケラチノサイトの角質化に関与する分化マーカーであるタンパク質の分布について解析した。まず、傷つけ後各時間の同一切片上において、抗loricrin抗体と抗involucrin抗体を用いて酵素抗体法による二重染色を行った(図3; 上, 中段)。傷つけ直後の0hPWでは、創縁、正常域ともloricrin(茶

色)よりも1細胞分下層から involucrin (青色)の染色がみられた(図3A)。下段では、隣接切片を各抗体単独で蛍光抗体染色した結果を示す(図3)。創縁の表皮が創部を被覆し終えた傷つけ48時間後も、正常域と同様のパターンが示された(図3B)。ところが、創部表皮が肥厚している傷つけ後96, 120時間においては、肥厚部の表皮ではloricrinとinvolucrinが同一細胞層から上層で染色された(図3D, E)。しかし、loricrinの発現が1段下からになったのか、それともinvolucrinの発現が1段上からになったのかは、今回の実験だけではわからなかった。そして、創部表皮が薄化している傷つけ後144時間では、正常時と同様な染色パターンを回復した(図3F)。

次に、抗involucrin抗体と抗profilaggrin/filaggrin抗体を用いて、傷つけ後各時間の同一切片で二重免疫組織染色を行った(図4; 上, 中段)。傷つけ直後の0hPWでは、創縁、正常域ともにinvolucrin (茶色)よりも1細胞分下層からprofilaggrin/filaggrin (青色)の染色がみられた(図4A)。しかしながら、loricrinとinvolucrinの染色とは異なり、involucrinとprofilaggrin/filaggrinは創閉鎖後の肥厚した表皮においても常に正常域と同じ染色パターンを維持し続け、薄化する時期まで変化はみられなかった(図4B-F)。以上のことから、創部における表皮の厚さの変動の一因として、ケラチノサイトの分化の停留あるいは分化速度の変動が考えられる。

表皮ケラチノサイトの終末分化に関与する分子の発現

続いて、表皮ケラチノサイトの終末分化の初期に関与するC/EBP- α と、後期に関与するcaspase-14の免疫組織染色を行った。傷つけ直後では、C/EBP- α は有棘層以上の層における核と細胞質が強く染まり、caspase-14は顆粒層の細胞質が強染された(図5A, H)。傷つけ後24時間では、両者ともに、傷を被覆した表皮シートの先端端における染色強度の低下がみられた(図5B, I)。傷つけ後48時間になると、創部表皮における発現はC/EBP- α , caspase-14ともに回復し、創部表皮の肥厚化が始まる時期である傷つけ後72時間でも同様の傾向が示された(図5C, D, J, K)。そして、創部表皮の肥厚がピークに達する傷つけ後96時間では、創部表皮におけるcaspase-14による強染領域は上層部のみにみられ、それより下層部にはcaspase-14で染色されない領域が広くみられた(図5L)。続く、薄化が始まる時期に相当する傷つけ後120時間では、創部表皮におけるcaspase-14の強染領域が、より下方へ拡大する傾向が示された(図5M)。この傷つけ後96-120時間において、C/EBP- α の染色は大きな変化が観察されなかった(図5E, F)。傷つけ後144時間になると、どちらの染色パターンも定常時のものへと回復する傾向が示された(図5G, N)。以上のことから、創部表皮の厚さの変動には、ケラチノサイトの

終末分化の後期で働く **caspase-14** の発現の抑制と亢進が関与していることが示唆された。

考察

本研究では、ラット新生児皮膚の切創の治癒経過は以下のとおりであった。まず創周囲の表皮細胞がシートの状態を保ったまま急速に伸展して傷を覆い、創閉鎖をした表皮シートは創部において真皮側へ肥厚した。その後、基底層の細胞と基底膜が apical 側へ上昇するのに伴い創部の表皮は薄化していき、正常状態に至った（図 6）。これらのことは、切創の断面の HE 染色や表皮細胞の分化段階のマーカーになり得る各種ケラチンの抗体染色等から明らかになった（図 1）。本研究では、この表皮の厚さが変動する要因を探究することを目的として、ラット新生児の背部皮膚に施した切創の形態学的解析をさらに進めた。

肥厚した創部表皮の薄化時には表皮上部で細胞死が増加する

表皮の厚さが変動することは表皮細胞数の増減に相関することが考えられた。実際、創部表皮細胞数は、創閉鎖完了後の傷つけ後 48 時間から表皮が肥厚する 72, 96 時間にかけて増加し、定常時の厚さへと薄化していく 120, 144 時間では減少していくことが示された（図 2Q）。細胞数が増減するメカニズムとしては、様々な可能性が考えられるが、ここではまず増殖している細胞を検出する抗 BrdU 抗体染色と、アポトーシスを検出する TUNEL 染色を行った。

創部表皮および正常域表皮中の全 DAPI 陽性細胞に対する BrdU 陽性細胞の割合を算出したところ、創部および正常域のいずれにおいてもその割合は、傷つけ直後から、傷が創縁から這い出した表皮によって覆われた 48 時間、創部表皮が最も肥厚している 96 時間、次第に薄くなっていく 120, 144 時間の間で、大きな変動はみられなかった（図 2A-H）。つまり、創閉鎖後の創部表皮の厚さの変動と増殖細胞の割合は相関しなかった。正常皮膚における BrdU 陽性細胞の割合のグラフをみると、有意差はなかったものの、傷つけ後の時間が進むに従って、すなわち個体の成長に従って増加しているようにも見える（図 2H）。だが、ラットの背部表皮は新生児期が最も厚く、成体では薄くなることから（表皮の厚さについては第三章 図 8A と図 12A を参照されたい）、正常皮膚におけるこの数値の増加は、BrdU 陽性細胞の絶対数の増加を反映するものではないと考えられる。

一方、同様に算出した TUNEL 陽性細胞の割合をみると、正常域の表皮では BrdU

陽性細胞と同様に傷つけ直後から 144 時間の間で平均値に大きな変動はなかった (図 2P)。しかし、創部表皮では、傷つけ後の時間によって TUNEL 陽性細胞の割合に変化がみられた。傷つけ後 48 時間では創部表皮の TUNEL 陽性細胞の割合が少し増加し、96 時間には傷つけ直後や正常な表皮と同程度に収まったが、創部表皮の薄化期である 120 時間には陽性細胞の割合が傷つけ直後の 1.4 倍以上に増加し、144 時間ではピークを過ぎて緩やかに減少した (図 2I-O)。さらに、この傷つけ後 120, 144 時間の創部表皮における TUNEL 陽性細胞の割合は、それぞれの正常域の値と比較しても有意な差があることが示された (赤色 **; $p < 0.01$, 赤色 *; $p < 0.05$)。以上のことから、創部表皮における TUNEL 陽性細胞の割合の変動は、肥厚した表皮が薄くなる過程、時期と一致しているようにみえた。TUNEL 解析の結果は、アポトーシスが表皮の厚さの減少に部分的ながら寄与している可能性を示しているともみることができる。

終末分化する表皮の顆粒層では、角質層の直下においてしばしば TUNEL 陽性細胞が観察されるが (McCall and Cohen, 1991)、近年の研究では、アポトーシスとケラチノサイトの終末分化は分子経路が異なるという報告がなされている (Rendl *et al.*, 2002; Lippense *et al.*, 2005)。しかし、活性化された caspase-14 を発現している顆粒層のケラチノサイトが TUNEL 陽性を示すことは、DNA の分解に関する caspase-14 の生理学的な役割を示唆している、という論文もある (Hibino *et al.*, 2010)。つまり、本研究で観察された創部肥厚化表皮が薄化するとき顆粒層上部で TUNEL 陽性細胞が増加する事象は、角質化の結果であることも考えられるため、次に創部表皮の終末分化について解析した。

厚さが変動する創部表皮ではケラチノサイトの終末分化に乱れが生じる

表皮の最下層にある基底層に存在する幹細胞の非対称分裂によって生じた娘細胞の 1 つは終末分化へと傾倒し、3 つの異なる分化段階；有棘層、顆粒層、角質層を経て脱落する。この基底層から角質層までの終末分化の間に、表皮細胞は形態、転写、機能の面で大きな変化を遂げる (Fuchs, 2008)。基底層ではケラチン K5 と K14 を発現していたケラチノサイトは、有棘層に入ると代わりにケラチン K1 と K10 を発現するようになるとともに、involucrin, filaggrin, loricrin といった終末分化マーカーであるタンパク質を発現するようになることが知られている (Tseng and Green, 1994)。

ラット新生児の正常表皮では有棘層上部から上層で発現する involucrin と顆粒層から上層で発現する loricrin を、創部皮膚の隣接切片で抗体染色し、それぞれの発現領域を比較したところ、創部表皮が肥厚している傷つけ後 96, 120 時間の肥厚部の表皮で

は、loricrin と involucrin が同一細胞層から上層で発現し（図 3D, E），創部表皮が薄化すると正常時と同様な染色パターンを回復した（図 3F）。一方，同様に本研究では有棘層中部から上層で発現した profilaggrin/filaggrin の抗体染色と involucrin 抗体染色で隣接切片間での比較を行ったところ，傷つけ後の全時間において染色領域に変化はみられなかった（図 4）。このことは，創部表皮の肥厚部では，有棘層上部から顆粒層の段階に相当するケラチノサイトの分化機構に，変化が起きているという可能性を示している（図 6）。

以上のことから，次のように推察した（図 7）。まず，創閉鎖後の創部表皮は，基底細胞の増殖と分化によって有棘層と顆粒層のケラチノサイトを増加させ，有棘層から顆粒層にかけての分化を遅延させることによって肥厚する。その後，分化速度の急激な加速によって表皮ケラチノサイトは急速に角質化し，創部表皮の厚さは定常状態を回復する。実際，創部表皮が肥厚した以降の創部の表皮上層では，分厚く多層化した角質層が観察された。このことも，肥厚した創部表皮が薄化する過程では，一過性の角質化の亢進が起きていることを支持する。

創部表皮の厚さの変動と角質化には相関がある

さらに，ケラチノサイトの終末分化に関与する C/EBP- α と caspase-14 の免疫組織染色をおこなった。C/EBP- α は終末分化の初期に働く転写因子であり(Oh and Smart., 1998; Maytin *et al.*, 1999), caspase-14 は終末分化の後期の角質化に関与するタンパク質分解酵素である(Lippens *et al.*, 2000; Denecker *et al.*, 2008)。それゆえ，分化マーカーと同様に，どのあたりの分化段階の細胞が創部表皮の厚さの変動に寄与しているのかを明らかにできると期待した。

結果は，前述の分化マーカーとほぼ同様な変化を示した（図 6）。創閉鎖のために表皮シートが移動している時期には，先端端で C/EBP- α , caspase-14 とともに低下したが，これは抗体染色によって示されたケラチン K10 発現の低下と K14 発現の広域化という事実符合する（図 5B, I）。続いて，傷つけ後 96 時間では，創部表皮における caspase-14 による強染領域は上層部のみにみられ，それより下層部には caspase-14 で染色されない領域が広くみられた（図 5L）。この結果から，肥厚時の創部表皮では，caspase-14 の発現が抑制されたことによって角質化が遅延しているか，もしくは，顆粒層より下層における終末分化過程の遅延あるいは細胞増殖が活性化されたことによって創部表皮全細胞における顆粒細胞の割合が減少しているのではないかと推測された。そして，傷つけ後 120 時間において，創部表皮における caspase-14 の強染領域がより下方へ拡大

したことから、薄化する時には **caspase-14** の発現が亢進するか、または短期間で顆粒細胞が増加して、滞っていた終末分化が急激に進行するのではないかと考察した（図 5M）。

以上のことから、新生児ラット皮膚に施した切創の再上皮化過程における創部表皮の厚さの変動の要因の一つは、表皮ケラチノサイトの終末分化と角質化の遅延と亢進であると結論づけた（図 7）。創閉鎖後の創部表皮の肥厚-薄化の機構を解明するためには、細胞の運動や増殖、シグナル伝達等の観点からの遺伝子発現解析を含む更なる解析を必要とする。

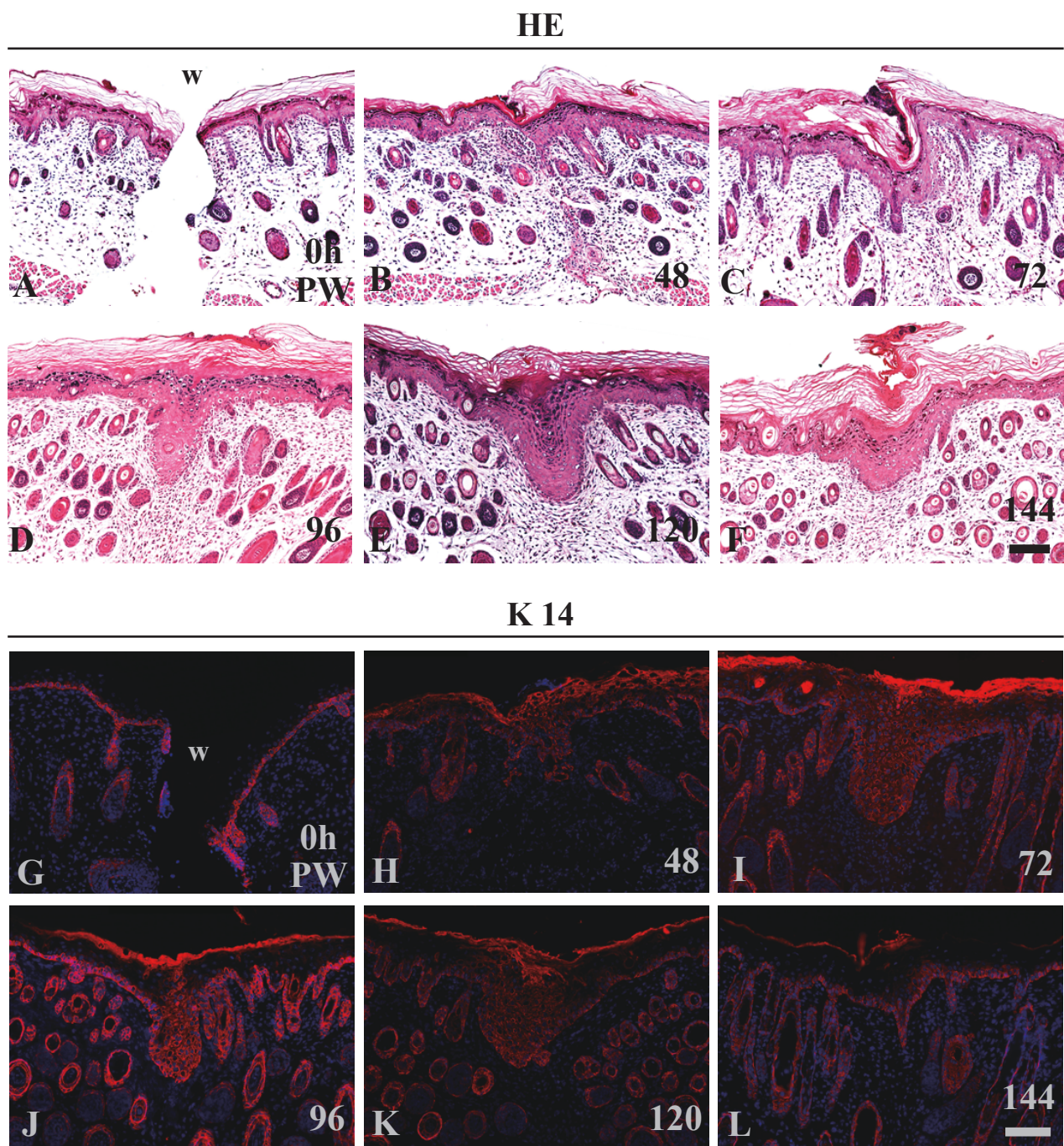
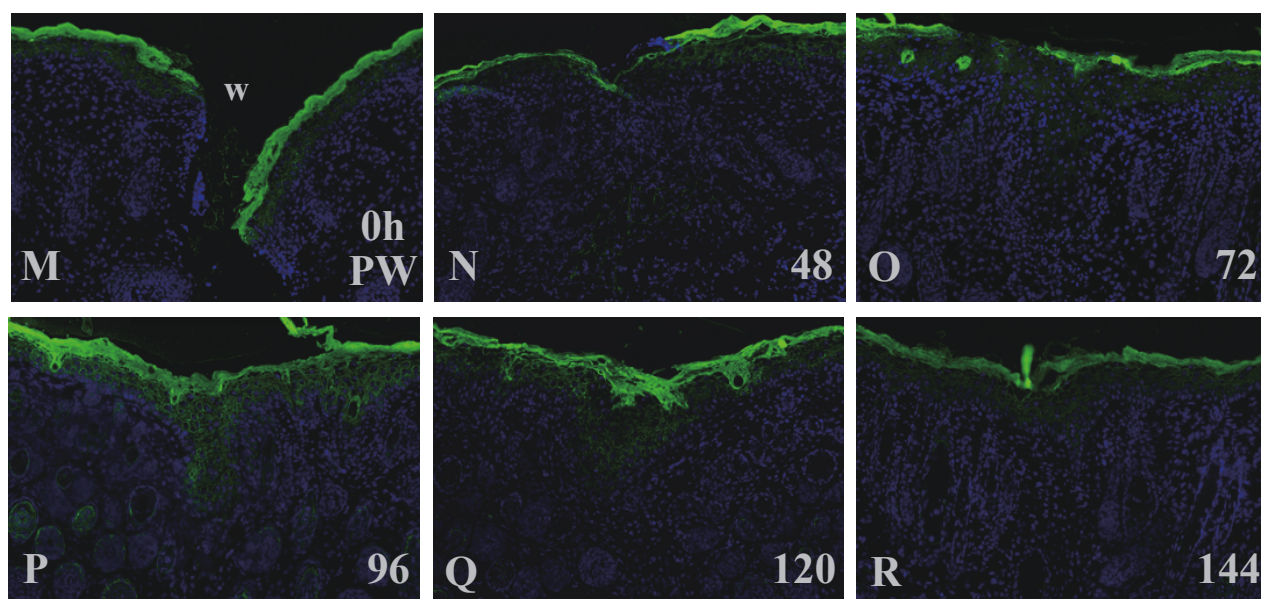


図1 ラット新生児皮膚の再表皮化過程における形態学的，免疫組織化学的变化

K 10



K 6

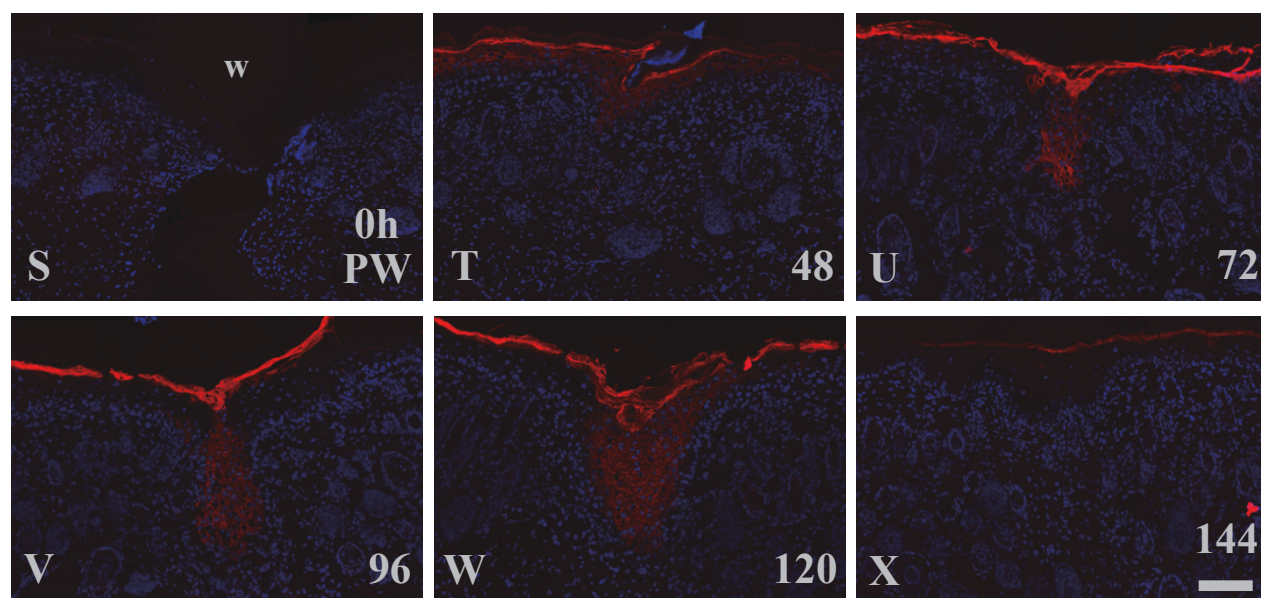


図1 ラット新生児皮膚の再表皮化過程における形態学的，免疫組織化学的变化

切創の垂直切片を作製し，それぞれ HE 染色 (A-F) と，連続切片で抗ケラチン K 14 (G-L)，K 10 (M-R)，K 6 (S-X) 抗体染色した。傷つけ直後 (0 h PW) では，K 14 は基底細胞層 (G)，K 10 は有棘細胞層と顆粒細胞層 (M) で発現し，K 6 はみられなかった (S)。傷つけ後 48 時間までに創閉鎖は完了し (B)，創部および創周囲表皮においては，K 14 陽性細胞の分布が顆粒層まで拡大し (H)，K 6 は有棘層以上で発現がみられるようになり (T)，対照的に K 10 は創部での発現が弱くなった (N)。傷つけ後 72 時間までに創部表皮は真皮側へ肥厚し始め (C)，傷つけ後 96 時間で厚さはピークに達した (D)。その後，肥厚した表皮は傷つけ後 120 時間までに一転して薄化し始め，傷つけ後 144 時間で正常時の厚さへ回復した (E，F)。この傷つけ後 72 から 144 時間の間に，K 14 と K 6 発現の拡大および K 10 の弱化は，傷から離れた領域から次第に正常状態へ回復していった (I-L，U-X，O-R)。スケールバー，100 μ m ; w，創；核染色，DAPI。

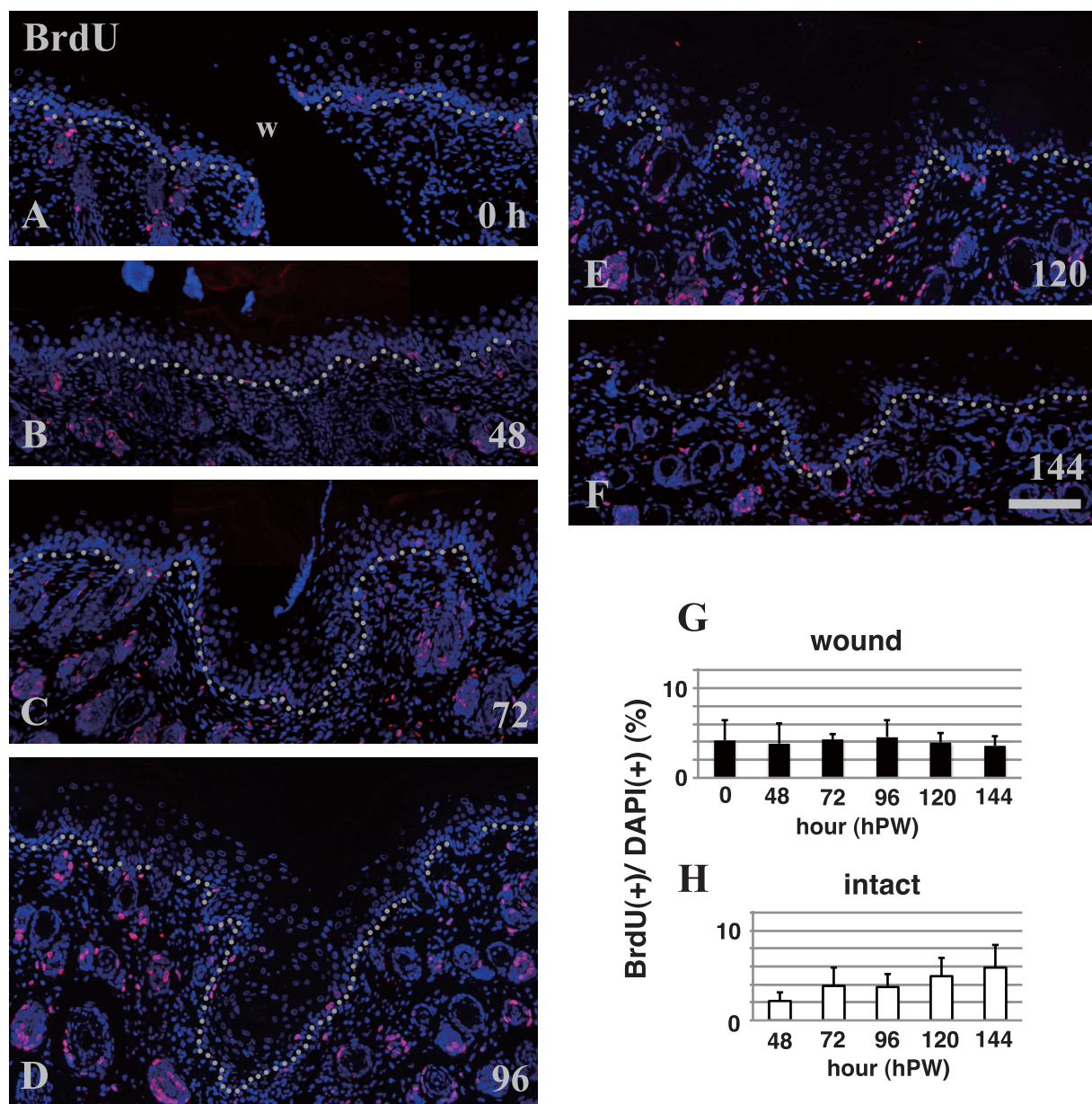


図2 創部および正常部表皮における細胞増殖とアポトーシス

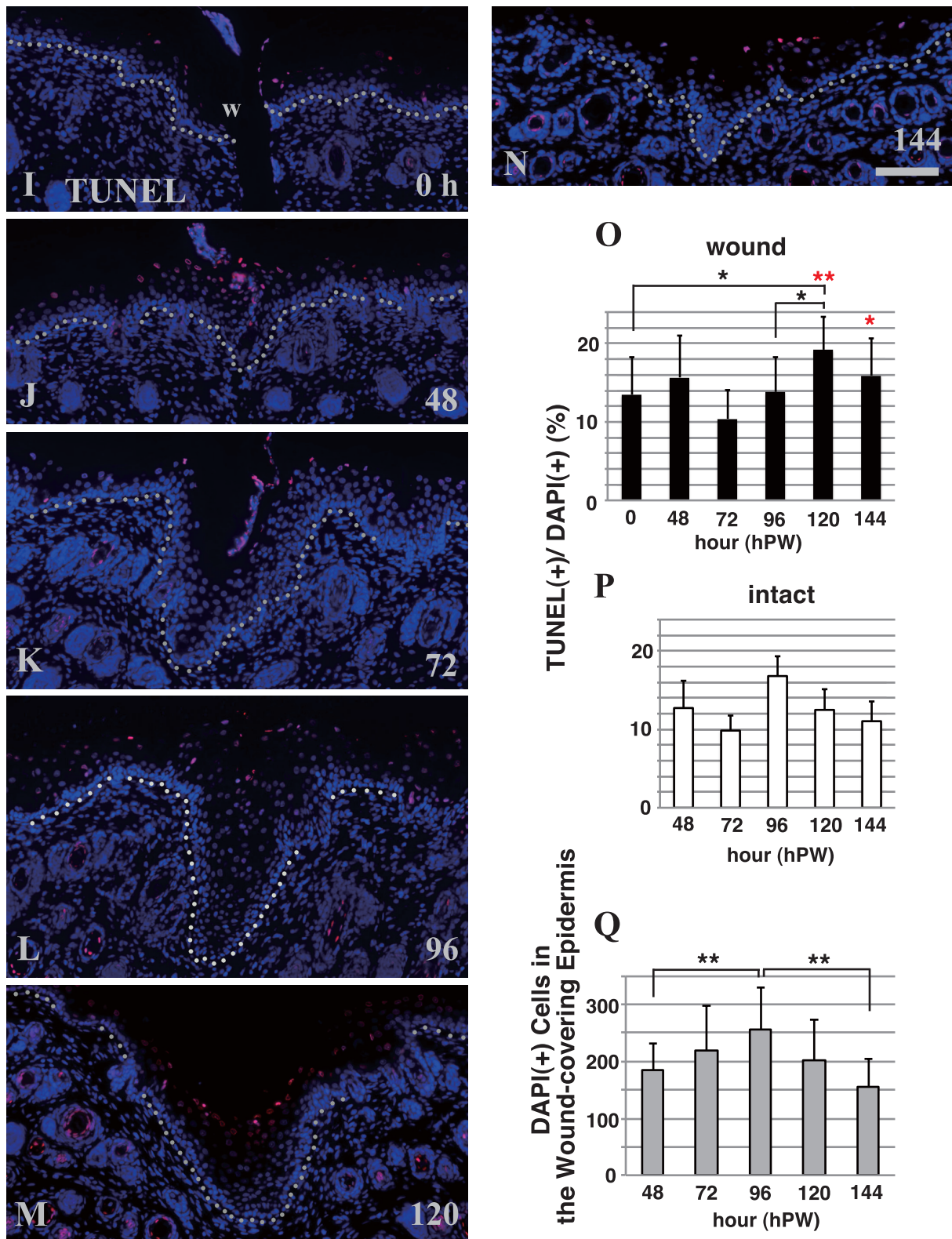


図2 創部および正常部表皮における細胞増殖とアポトーシス

増殖細胞を表す BrdU 陽性細胞数の表皮全生細胞数に対する割合は、創部ならびに正常部において、傷つけ後の全時点を通して大きな変化はみられなかった (0-144 h PW, A-G)。対照的に、アポトーシスする細胞を示す TUNEL 陽性細胞数の表皮全生細胞数に対する割合は、薄化する創部表皮において増加した (傷つけ後 120 時間前後), (I-O)。創部表皮における全 DAPI 陽性細胞数は、肥厚時に増加し、薄化時には減少した (Q)。スケールバー, 100 μ m ; w, 創 ; h PW, 傷つけ後の時間 ; 点線, 表皮と真皮の境界 ; 核染色, DAPI ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; * および **, 正常部の値との比較。

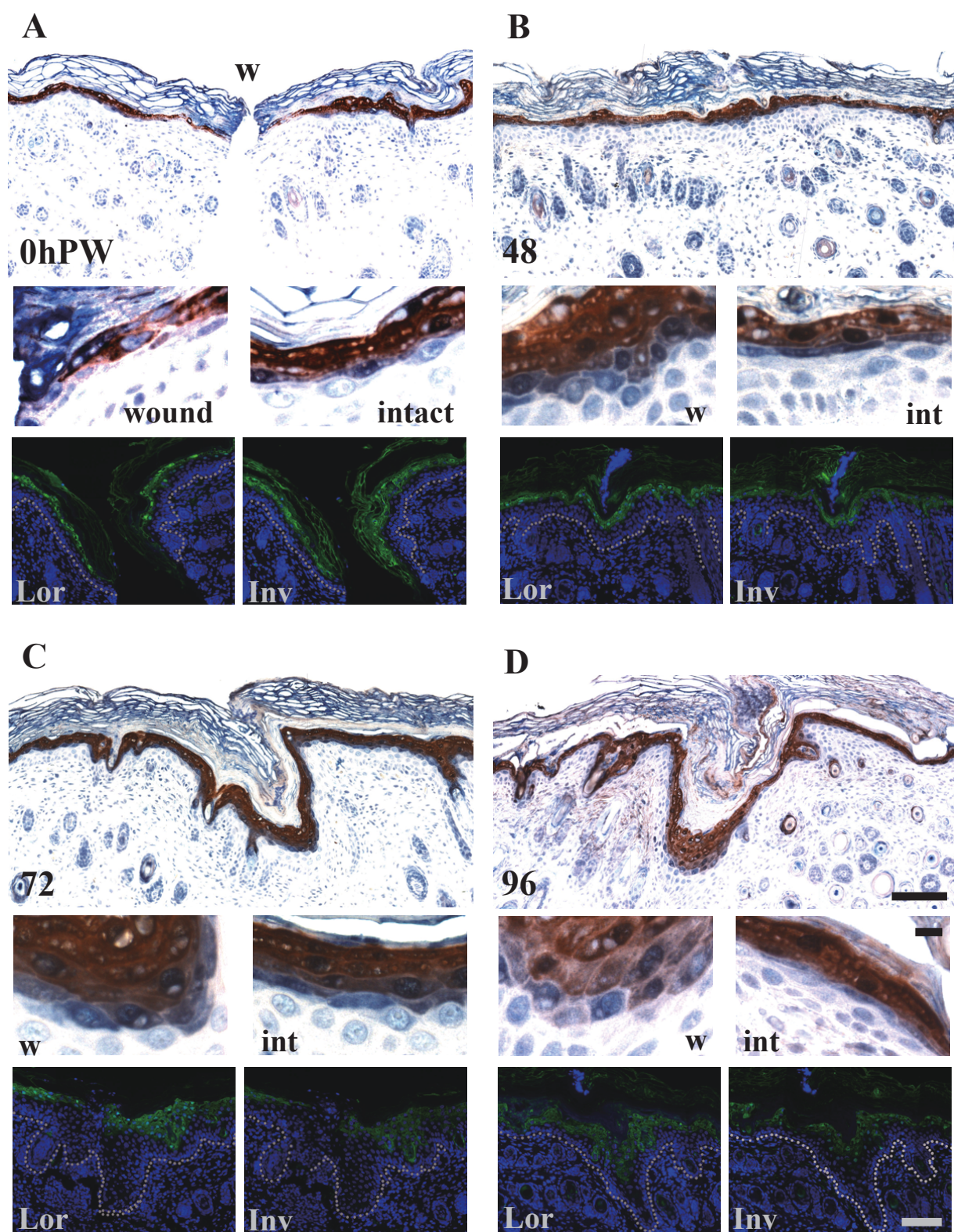


図3 創部表皮の薄化時には loricrin と involucrin の発現開始層が一致した

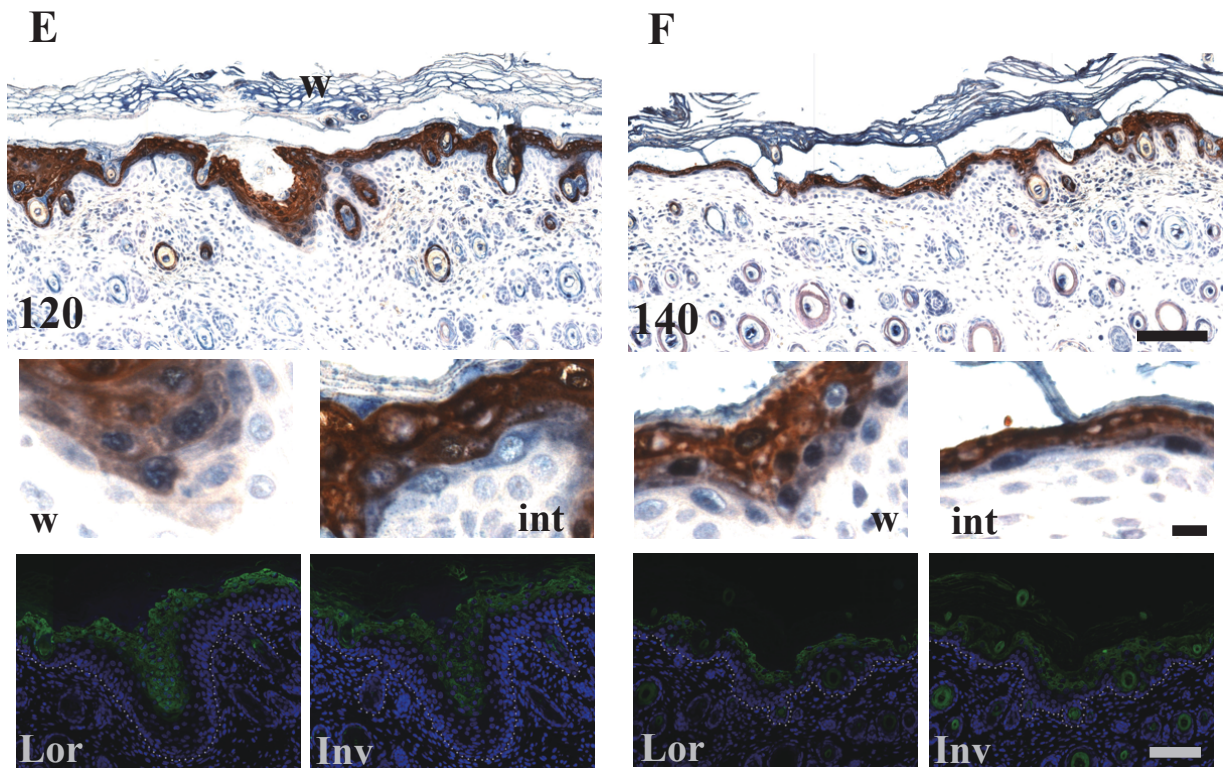


図3 創部表皮の薄化時には loricrin と involucrin の発現開始層が一致した

上図および中図〔左 (w), 創部拡大; 右 (int), 正常部拡大〕は, 抗 loricrin (褐色) と抗 involucrin (青色) 抗体の二重染色画像, 下図は, 隣接切片における両抗体の単染色画像 (緑色) を示す。傷つけ直後の新生児皮膚では, loricrin (褐色) は顆粒層以上で発現し, involucrin (青色) は有棘層上部から発現し始めた (A)。ところが, 傷つけ後 96, 120 時間の肥厚した創部表皮では, 両分化マーカータンパク質は同一細胞層以上から検出された (D と E の創部)。スケールバー, 上から 100 μm , 10 μm , 100 μm ; w, 創; 点線, 表皮と真皮の境界; 核染色, ヘマトキシリンおよび DAPI。

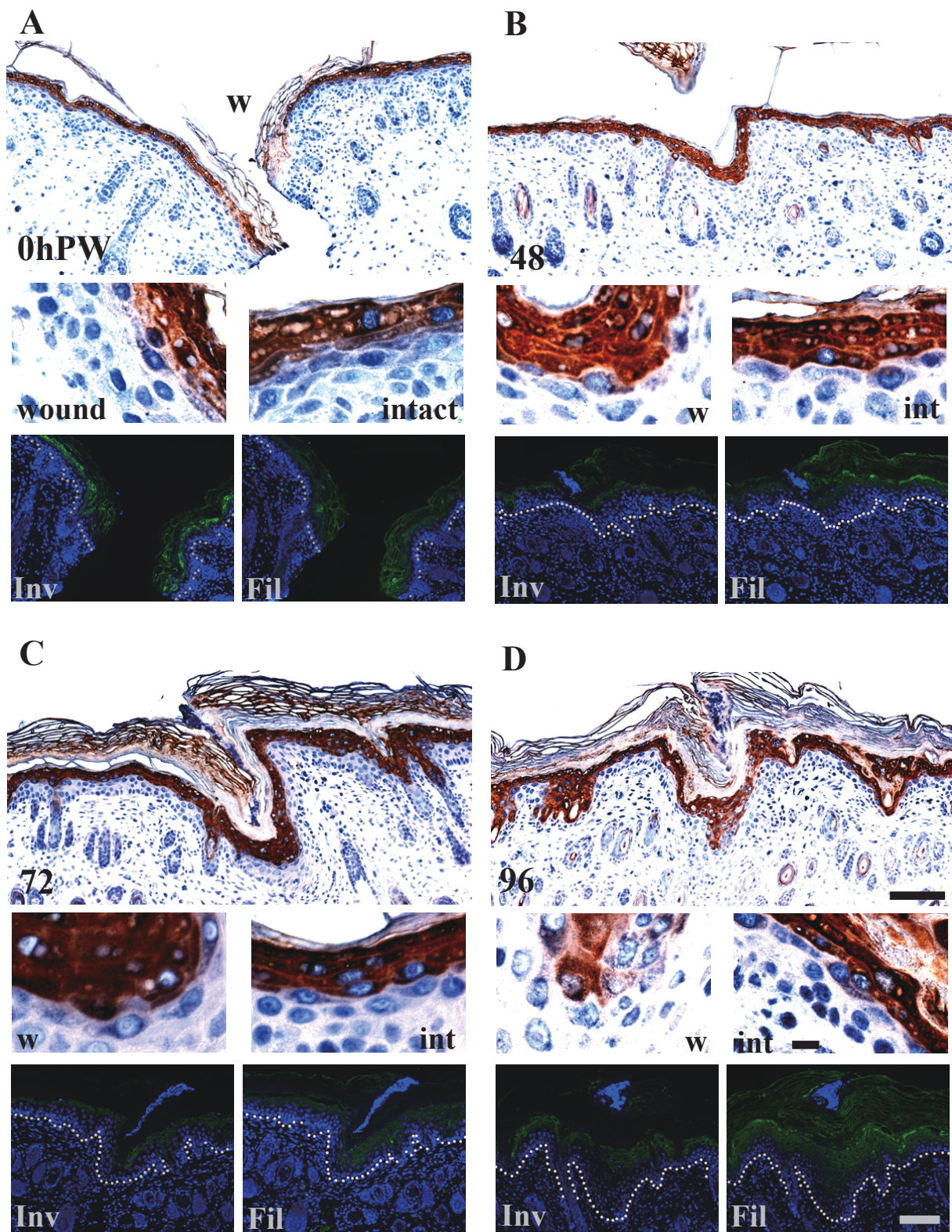


図4 再表皮化過程において filaggrin の発現パターンは変化しない

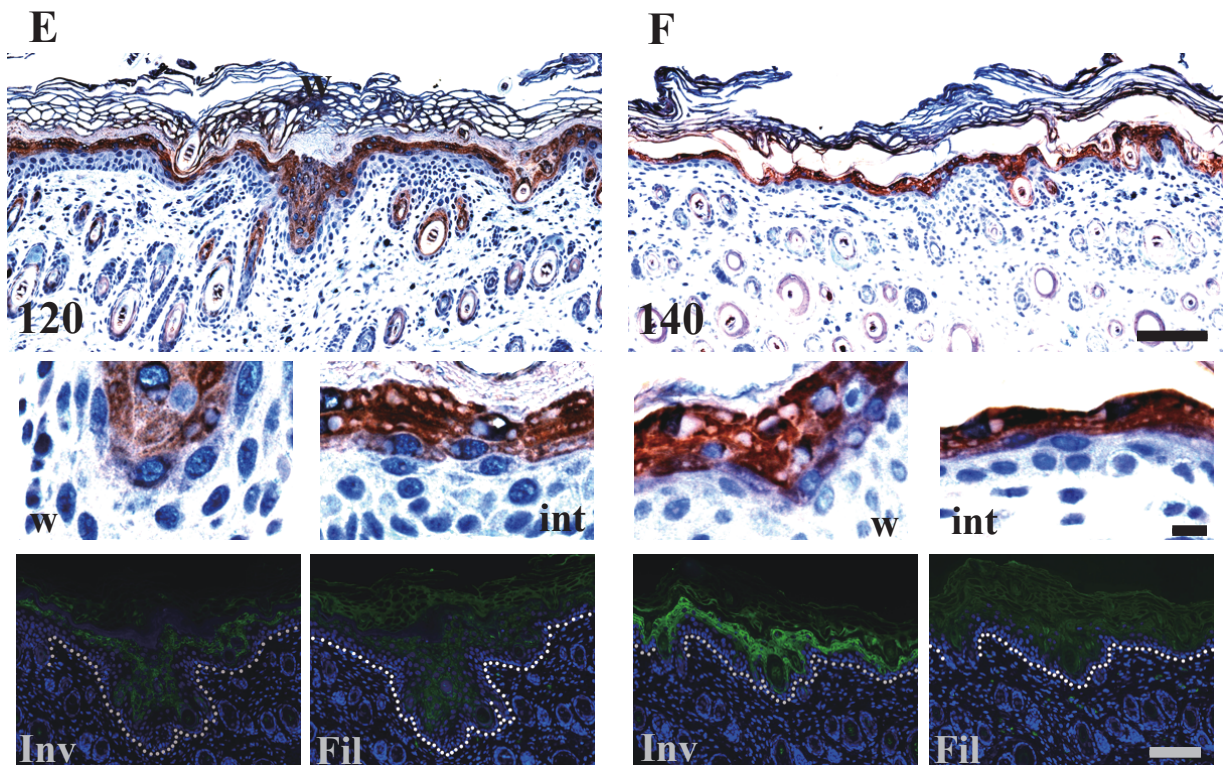


図4 再表皮化過程において filaggrin の発現パターンは変化しない

上図および中図〔左 (w), 創部拡大; 右 (int), 正常部拡大〕は, 抗 involucrin (褐色) と抗 filaggrin (青色) 抗体の二重染色画像, 下図は, 隣接切片における両抗体の単染色画像 (緑色) を示す。傷つけ直後の新生児皮膚では, 有棘層上部から上で発現した involucrin (褐色) とは異なり, filaggrin (青色) は有棘層中部以上で発現した (A)。そして, 図3とは異なり, involucrin と filaggrin のこの階層性は傷つて後 140 時間まで維持され, 変化はみられなかった (B-F)。スケールバー, 上から 100 μm , 10 μm , 100 μm ; w, 創; 点線, 表皮と真皮の境界; 核染色, ヘマトキシリンおよび DAPI。

C/EBP- α

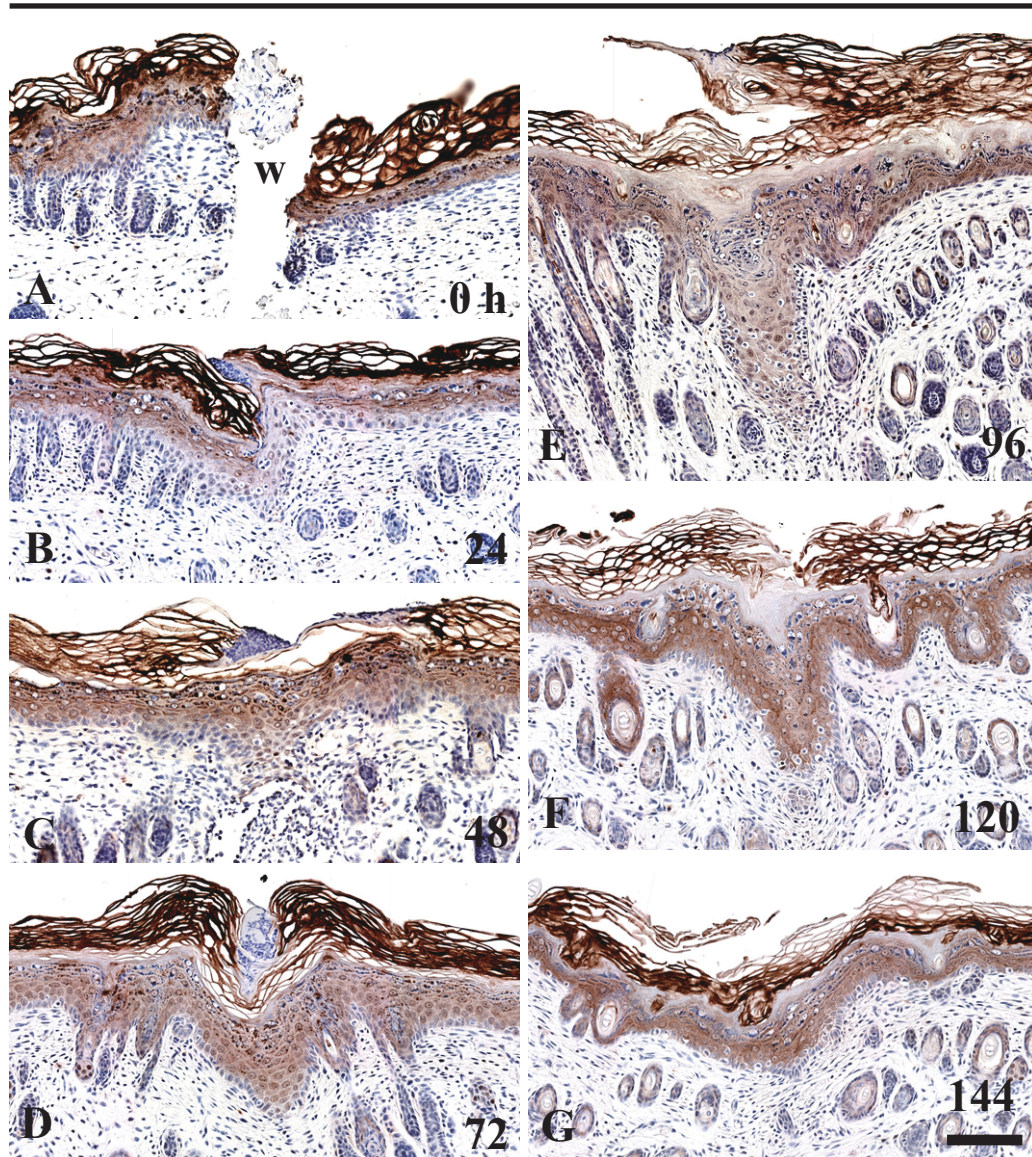


図5 創部表皮における C/EBP- α と caspase 14 の発現

caspase-14

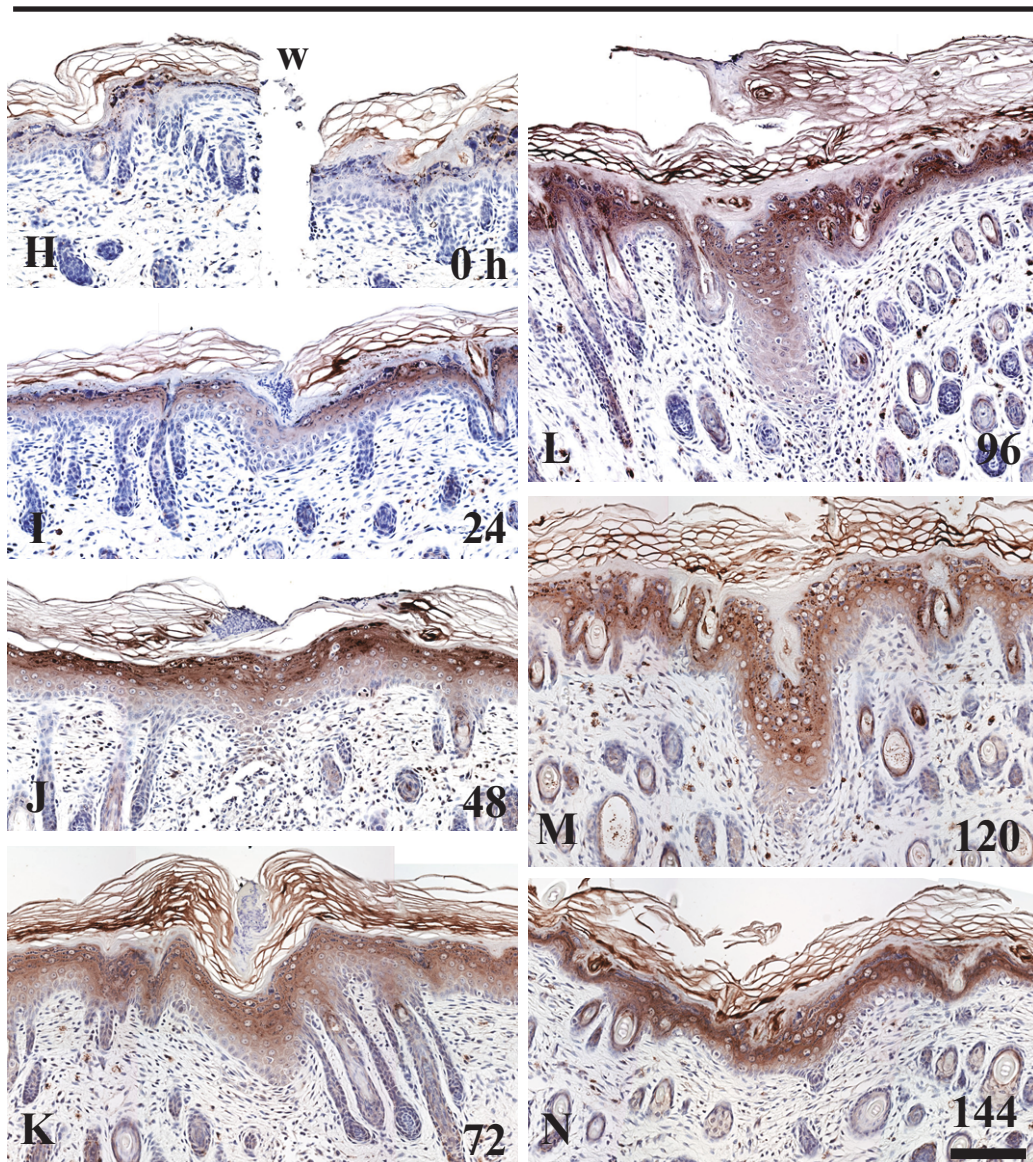


図5 創部表皮における C/EBP- α と caspase 14 の発現

それぞれ、C/EBP- α (A-G) と caspase-14 (H-N) の分布を免疫組織染色で示した。傷つけ直後の新生児皮膚では、C/EBP- α は有棘層以上 (A), caspase-14 は顆粒層 (H) で発現がみられた。傷つけ後 24 時間では、両分子とも創縁における発現が弱くなったが (B, I), 創閉鎖が完了すると (傷つけ後 48 時間), 創部を被覆した表皮での両分子の染色強度は正常部と同等に回復した (C, J)。その後、創部表皮の厚さが変動しても C/EBP- α 陽性細胞の分布には大きな変化はみられなかった (D-G)。対照的に、傷つけ後 96 時間の肥厚した創部表皮では、抗 caspase-14 で染色されない領域がより拡大した (L)。そして、創部表皮が薄化している傷つけ後 120 時間では、一転して抗 caspase-14 で強染される領域がより下層まで広がった (M)。スケールバー, 100 μ m ; w, 創 ; 核染色, ヘマトキシリン。

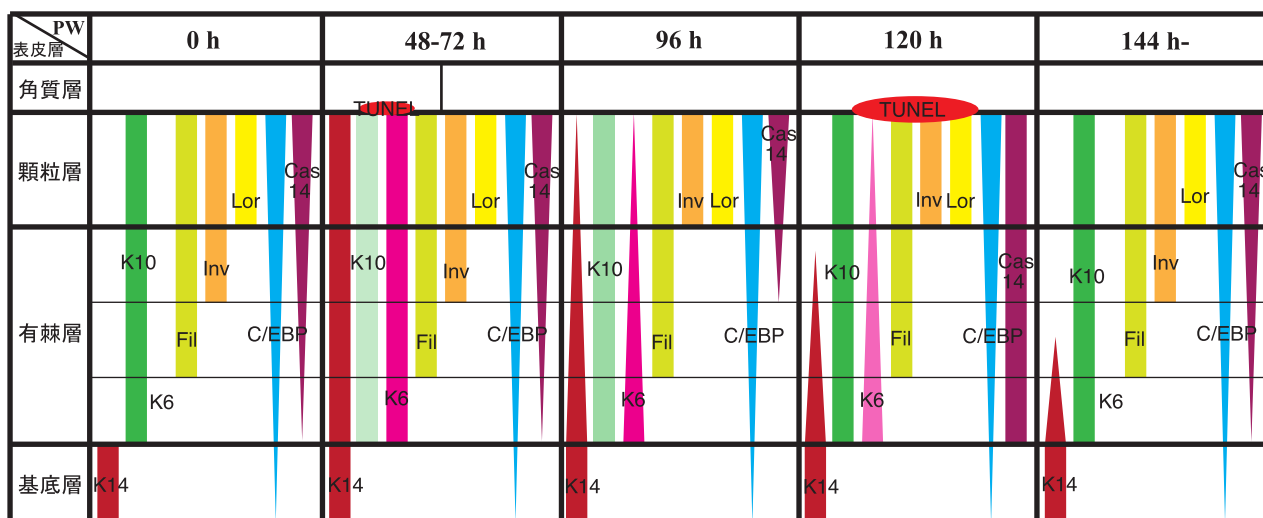


図6 再上皮化過程における表皮ケラチノサイトの分化マーカーの発現変化

再上皮化過程における表皮ケラチノサイトの分化マーカーの発現変化を、表にまとめた。傷つけ直後の表皮は、正常皮膚と同様の発現パターンを示す（左から、ケラチン K 14, K 10, K 6, filaggrin, involucrin, loricrin, C/EBP- α , caspase-14）。創閉鎖が完了した傷つけ後 48 時間では、創周囲表皮でケラチン 3 種の発現パターンが変化し、顆粒層上部では TUNEL 陽性細胞が観察される。創部表皮の肥厚期である傷つけ後 72 時間でも、ケラチンの発現の変化は継続される。創部表皮が最も肥厚している傷つけ後 96 時間では、肥厚した創部表皮では involucrin と loricrin が同じ層から発現するようになり、表皮の下層では caspase-14 陰性領域が拡大する。創部表皮の最肥厚時には、有棘層から顆粒層で表皮ケラチノサイトの終末分化が遅延していると考えられる。創部表皮が薄化し始めている傷つけ後 120 時間になると、involucrin と loricrin の同層からの発現は継続されるが、創部表皮の顆粒層あたりでは TUNEL 陽性細胞が増加し、caspase-14 陽性領域が創部表皮の下層まで拡大する。創部表皮の薄化開始期には、有棘層で表皮ケラチノサイトの終末分化が、顆粒層では角質化が亢進していることを示唆する。創部表皮の薄化が進行した傷つけ後 144 時間には、involucrin と loricrin, caspase-14 の異常な発現が正常状態へ回復し、ケラチンの発現パターンも次第に正常に戻る。縦軸；創部表皮の細胞層、横軸；傷つけ後の時間。

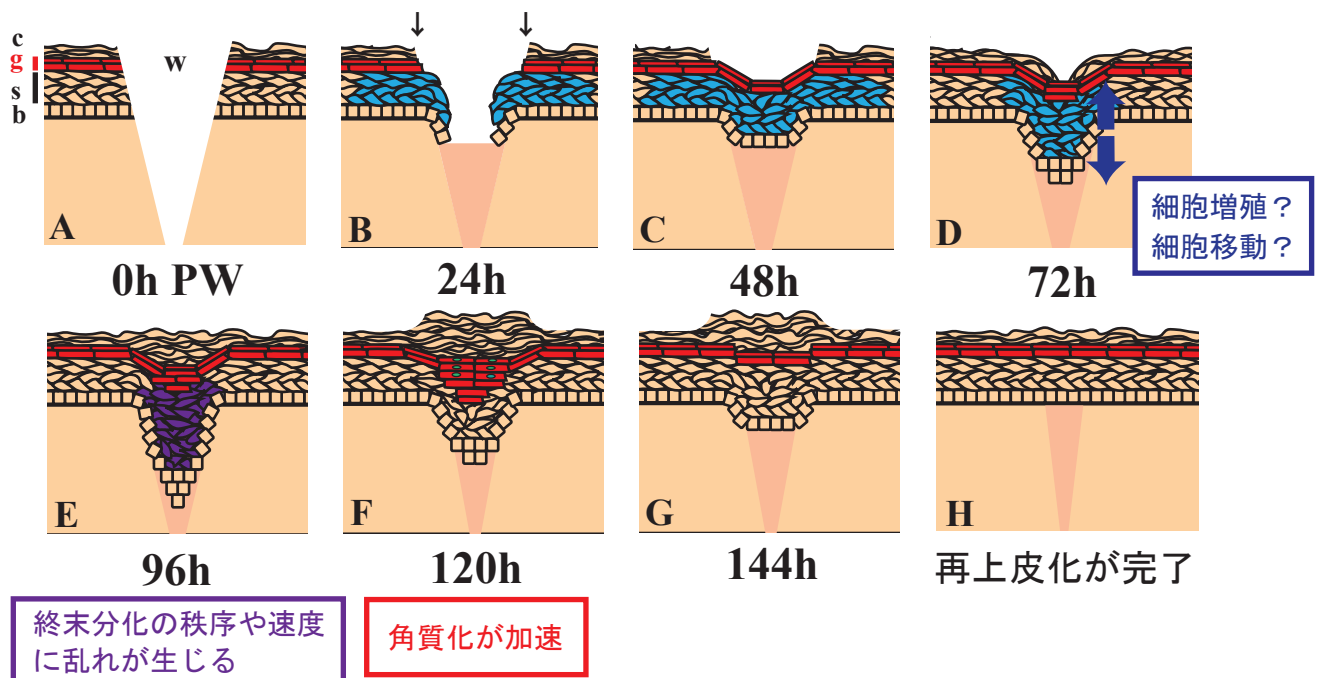


図7 新生児ラット皮膚の再上皮化過程の模式図

傷つけ直後の表皮は、正常皮膚と同様の秩序立った層構造を形成している（A；顆粒細胞層，赤色）。傷つけ後24時間までに、基底細胞と”immature spinous cells”（K14とK6陽性だが，その他分化マーカーは陰性，青色）（Koizumi *et al.*, 2004, 2005）から構成される創縁表皮が創床へ移動を開始する（B）。傷つけ後48時間前後で創閉鎖は完了し（C），創部を被覆した表皮は傷つけ後72時間までに肥厚し始めるが，この原因は不明である（D；青矢印）。傷つけ後96時間では，創部表皮はさらに肥厚して厚さは極大に達し，有棘細胞層においてセラチノサイトの終末分化に乱れが生じる（E；紫色）。傷つけ後120時間になると，受創に誘引されて肥厚した表皮は，角質化の亢進を含むいくつかの機構によって薄化し始める（F；顆粒細胞が増加，赤色；TUNEL陽性細胞，緑色の核）。傷つけ後144時間以降に，創部表皮は正常な厚さに回復する（G，H）。b，基底細胞層；s，有棘細胞層；g，顆粒細胞層；c，角質層；w，創；黒矢印，初期創縁位置。

第三章

真皮非依存的な表皮の潜在能力による微小創の創閉鎖

要旨

表皮と真皮から構成される皮膚の再上皮化は、多くの性質が異なる細胞や組織が複雑に相互作用する過程であるため、全貌は未だ解明されていない。本章では、新生児ラット皮膚の創閉鎖過程における表皮本来の役割や振る舞いについて探求するために、真皮の損傷を最小限に抑えた“浅い切創（以降“微小創”と称する）”という新規の *in vivo* の傷モデルを作製した。微小創は、傷つけ後 12 時間までに創周囲の表皮シートの移動によって閉鎖され、この表皮シートでは活性化したミオシン軽鎖（p-MLC）が各細胞の細胞膜に沿って検出された。Rho-associated protein kinase（ROCK）の阻害剤である Y27632 を局所的に投与すると、p-MLC は創縁から消失し、傷つけ後 12 時間以内では創閉鎖が完了しなかった。Rac 1 の阻害剤である NSC23766 の局所投与では、傷つけ後 8 時間では発現していた p-MLC が傷つけ後 12 時間では消失し、Y27632 と同様に傷つけ後 12 時間以内では創閉鎖しなかった。以上の結果は、真皮の助けを得ずとも、表皮細胞には潜在的に、Rho ファミリースモール GTPases 依存的な個々の細胞の伸展と収縮によって制御された表皮シートの能動的な移動により、創閉鎖する能力があることを示唆している。

序論

皮膚は多細胞生物の最外層を覆う器官であり、体内を外環境と隔てることで生体の恒常性を維持する役割を担っている (Koster and Roop, 2007; Proksch *et al.*, 2008)。ゆえに皮膚が受創した場合、外界からの侵襲や体内からの水分損失を阻止するために、早急に修復して隔壁を再構成することが求められる。哺乳類の成体で皮膚に傷ができると、まずフィブリンクロットによって塞がれ、その後遅れて創縁から這い出してきた表皮によって創閉鎖が行われる (Martin and Parkhurst, 2004)。

上皮治癒様式は個体発生の段階によって異なることが知られており、ラット新生児の背部皮膚に全層欠損創を施すと、創周囲表皮の急速な伸展によって創部は覆われる (Koizumi *et al.*, 2004, 2005)。しかし、表皮と真皮という異なる 2 種の組織から構成される皮膚の再上皮化過程には、創部及び創周囲の多くの性質が異なる細胞や組織が動員されてそれぞれが複雑に絡み合いながら作用するため、その仕組みには未だ解明されていない部分が多い。

そこで、本研究では、創閉鎖に伴う表皮の移動を解析するために、真皮の損傷をできる限り小さく抑えた“微小創”を施した。本研究の傷は全層切創と異なり、表皮全層と真皮の上部 3 分の 1 程度のみを切断してそれ以下の皮膚は結合を保ち正常なまま残されるため、より簡素化された表皮創閉鎖の実験系となり、本質的な表皮の動向を解析することが期待された。ラット新生児皮膚にこの微小創をつけ、細胞の移動に関するアクチン細胞骨格や、アクチン線維を細胞骨格とするアドヘレンスジャンクションを構成する膜貫通型細胞間接着分子であるカドヘリン、上皮特異的中間径線維の一種であるケラチン等の抗体を用いて、創縁表皮の動きや形態学的な変化を免疫組織化学的に解析した。

創縁表皮シートの移動には、Rho ファミリースモール GTPases を介したアクチン細胞骨格の調節が不可欠であることが知られている (Brock *et al.*, 1996; Van Aelst & Symons, 2002; Fukata *et al.*, 2003)。移動する細胞では、前方で Rac が活性化され葉状仮足を形成して細胞の伸展が起き、後方では Rho が活性化されてストレスファイバーの形成やミオシンのリン酸化によって、接着斑の形成や細胞の収縮が起こる (Chauhan *et al.*, 2011)。これら 2 つの Rho スモール GTPases 活性のバランスが細胞の運動や成形には重要であり (Nimnual *et al.*, 2003)、細胞の運動において Rac 1 と Rho A の働きは拮抗し、相互の活性を下方制御することが知られている (Sander *et al.*,

1999; Nimnual *et al.*, 2003; Burridge and Wennerberg, 2004; Chauhan *et al.*, 2011)。
しかし、こうした知見は少数例 (Baek *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2011) を除き、細胞培養系等、*in vitro* 解析系によるものであり、生体での検証は不十分であるのが現状である。そこで、本実験では上述の通りほぼ一組織のみに施す *in vivo* 創傷モデルを構築した上で、細胞移動に関わる Rho ファミリースモール GTPases の Rho A と Rac 1 の経路を創部局所的に阻害する試みを通して、生体における創閉鎖にどのような変化が起こるかを検証した。

本研究では、ラット新生児皮膚に施した今回の微小創は、傷つけ後 12 時間までに創部表皮の移動によって創閉鎖が完了し、この移動する創縁表皮では P-カドヘリンの発現パターンが変化し、K6 ケラチンや活性型のミオシン (p-MLC) が観察された。また、創部局所的に Rho-associated protein kinase (ROCK) を阻害したところ、創縁表皮における p-MLC は検出されず、12 時間では創閉鎖は完了しなかった。一方で、Rac 1 を阻害すると、傷つけ後 8 時間では観察された p-MLC が 12 時間では消失し、創閉鎖も 12 時間ではおこらなかった。以上の結果から、ラット新生児皮膚の創閉鎖は、主に Rac 1・Rho A 依存性のアクトミオシン系を介した、真皮非依存的な表皮自身の能動的な運動によって遂行されうる過程であることが示唆された。

材料と方法

傷つけ

生後 1 日目の新生児 Sprague-Dawley ラット（母親は清水実験材料より購入）に氷中で低温麻酔をかけ、背部皮膚に緑内障メス MICRO FEATHER No. 6320G (Feather) を用いて正中線と平行な浅い切創（微小創）を、正中線を挟んで左右一対ずつ施した。創部の化膿や感染症を予防するために傷の上からオプサイト (Smith & Nephew) を巻いた後、新生児を母親ラットのもとへ戻した。

成体ラットにも同様の方法で微小創を施した。

組織染色と免疫組織染色

創部皮膚は、氷中で安楽死させた後、傷つけ後 0, 6, 8, 10, 12, 18 時間に採皮した。採皮した皮膚片は、4%paraformaldehyde in PBS(-) で 1 時間固定した後、パラフィン包埋した。厚さ 4 μ m の切片を作成し、Masson's trichrome (MT) 染色または免疫組織染色を行った。免疫組織染色では、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) や 1 mM EDTA (pH 8.0) 等で適宜賦活化を行った後、1% normal horse serum を室温で 20 分間反応させ、抗体の非特異的結合をブロックした。一次抗体は 4℃で overnight 反応させ、二次抗体は室温で 2 時間反応させた。その後、0.1 μ g/ml の 4', 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Polysciences) で核染色し、観察した。

以下に使用した抗体を示す。一次抗体：mouse anti-cytokeratin 6 monoclonal antibody (mAb) (Progen, 1:50)；mouse anti-E-cadherin mAb (BD Transduction Laboratories, 1:500)；goat anti-mouse P-cadherin polyclonal antibody (pAb) (R & D Systems, 1:100)；rabbit anti-human myosin light chain (phosphor S20) pAb (abcam, 1:500)；rabbit anti-myosin pAb (SIGMA, 1:100)；mouse anti-actin mAb (MILLIPORE, 1:100)。二次抗体：Alexa fluor 594 goat anti-mouse IgG₁ (Molecular Probes, 1:1500)；Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG_{2a} (Molecular Probes, 1:500)；Alexa fluor 594 donkey anti-goat IgG₁ (Molecular Probes, 1:1500)；Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1:500)。

フィブリノゲンは、rabbit anti-fibrinogen (ABIN, 1:500) と HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulins (DakoCytomation, 1:100)を用いた酵素抗体法によって

染色した。

ラット表皮における細胞間の境界を可視化するために行ったレクチン染色では、biotinylated peanut agglutinin (PNA) (VECTOR LABORATORIES, 1:200)と Texas Red conjugated streptavidin (Thermo SCIENTIFIC, 1:1000)を用いた (Hyun *et al.*, 1984; Schaumburg-Lever, 1990)。

ROCK と Rac 1 の阻害

ROCK の阻害剤である Y27632 (SIGMA, 水に溶解) と Rac 1 阻害剤の NSC23766 (Calbiochem, dimethyl sulfoxide に溶解) を, 30 % Pluronic F-127 (Invitrogen) 中それぞれ終濃度 0.7 mM と 0.5 mM になるように調製した。濃度 30 %の Pluronic F-127 は, 体温ではゲル化する性質がある (Becker *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2006)。冷却した阻害剤と Pluronic F-127 の混合液を, 傷つけ直後の新生児皮膚の創部あたり 10 μ l ずつ局所的に塗布し, オプサイトを巻いて母親ラットのもとへ戻した。コントロールとして, 水または dimethyl sulfoxide と Pluronic F-127 の混合溶液を, 阻害剤溶液と同様に塗布した。

結果

新生児皮膚における微小創の治癒様式

マッソン・トリクローム (MT) 染色の結果から、本研究の微小創は表皮全層と真皮の乳頭層までを切断していて、真皮下部の網状層や皮筋層は無傷のままであることがわかる (図 8A)。傷つけ後 6 時間になると、表皮は切断面が滑らかになって丸みを帯び、傷つけ直後よりも創縁が接近していた (図 8B)。一方、真皮の切断部は開放されたままであった。傷つけ後 8 時間になると、表皮は全層が更に創部中央へ移動し、創縁表皮の先端端の一部は相互に接触していた (図 8C)。傷つけ後 12 時間では、創縁表皮が接着して創閉鎖が完了していた (図 8E)。このように、ラット新生児皮膚の微小創では、全層欠損創や切創でみられたような、表皮シートが真皮の創部表層上を這うように移動する創閉鎖様式 (Koizumi *et al.*, 2004) はみられなかった。また、全層欠損創の再表皮化過程で観察された表皮先端端の扁平化も、多くの微小創ではみられなかった。

一方、真皮では、早いものでは傷つけ 6 時間後から、創部に零型の空間が形成されているものが多くみられた (図 8A-F)。これは、表皮と結合する上層部のみが創部中央で接触し、創の下部は開いたまま残されるために形成されたと推測される。この零型の空間では、赤血球や細胞核がみられるが、膠原繊維を染めるアニリン青の染色はみられない。表皮創閉鎖が完了する傷つけ後 12 時間でも、真皮の創部には零型の空間が残されたままであり、傷つけ後 18 時間から 30 時間でも、真皮創傷部ではこの赤血球と細胞核のみが染色される間隙がみられた (図 8F, 未発表)。抗フィブリノゲン抗体染色の結果から、この真皮の間隙では傷つけ後 6 時間以降においてフィブリンの存在が示唆された (図 8G-J)。

カドヘリンとケラチンの発現

傷つけ直後の創周囲表皮では、基底層から顆粒層でE-カドヘリンが発現し、基底層のみでP-カドヘリンの発現がみられた (図9A, G)。傷つけ後6時間以降でも、E-カドヘリンの発現領域には変化がみられなかった (図9B-F)。一方、P-カドヘリンは、傷つけ後6時間の創周囲表皮での発現領域が、基底層より2から4層上層に位置する細胞にまで拡大した (図9H)。傷つけ後10時間になると、P-カドヘリンの発現領域の有棘層以上への拡大は創部から400 μm 以内の表皮に局限され、それ以上離れた領域では定常時

と同様に基底層1層のみで発現がみられた（図9J）。傷つけ後12, 18時間では、P-カドヘリンの多層での発現はさらに創縁に限定されていき、創部表皮が定常状態を回復していることが示唆された（図9K, L）。以上のP-カドヘリンの発現パターンは、全層切創の再表皮化過程と同様の傾向を示した（未発表）。

傷つけ直後の創周囲表皮では、正常皮膚と同様に、K6の発現は観察されなかった（図9M）。傷つけ後6時間の表皮でもまだK6は染色されなかったが（図9N）、傷つけ後8から10時間になると、創部表皮の有棘層がK6で染色される試料がいくらかみられた（図9O, P）。傷つけ後12時間では創縁を中心に400 μm 以上離れた領域の有棘層までK6の発現が確認され、傷つけ後18時間でも同様の傾向が示された（図9Q, R）。以前、同研究室でラットの新生児皮膚に全層欠損創を施した時にK6の発現は傷つけ後6時間から観察されていたこと（Koizumi *et al.*, 2004）と比較すると、微小創では、創縁表皮におけるK6の発現開始に数時間の遅れがみられた。

表皮シートの創部への移動にはミオシンが関与している

単体の細胞が移動するとき、前方にはアクチンフィラメントの重合によりラメリポディアやフィロポディアが形成され、後方では非筋ミオシンIIがリン酸化されることによって活性化して収縮が起こる（Pellegrin and Mellor, 2007; Chauhan *et al.*, 2011）。そこで、ラット新生児皮膚の微小創において、アクチンとミオシンII、活性化されたミオシン軽鎖（p-MLC）の発現を、免疫組織化学的手法を用いて解析した。

傷つけ直後の創周囲表皮では、アクチン、ミオシンIIともに発現がみられたが（図11A, E）、p-MLCの発現はみられなかった（図10A, F）。傷つけ後6時間になると、創縁の基底層から有棘層に該当する位置にある細胞の片側の側方面でp-MLCの発現がみられた（図10B, G）。この時、表皮ケラチノサイトの細胞膜に存在する糖鎖に特異的に結合するレクチンの一種であるPNA（赤色）との二重染色を行って細胞膜を可視化したところ、p-MLC（緑色）は、傷へ向かう表皮細胞の側面の細胞膜直下に発現していることが示された（図10K）。また、このp-MLCの発現は、創縁から正常域方向へ10個から20個離れた表皮細胞までみられた。傷つけ後8時間、10時間と、経時的に表皮におけるp-MLCの発現はより創縁近傍へ限局していき、創閉鎖が完了した傷つけ後12時間以降では、p-MLCの発現はほぼみられなくなった（図10C-E, H-J）。一方で、傷つけ後6時間以降においても、アクチンとミオシンIIの発現には変化がみられなかった（図11B-D, F-H）。以上の結果から、ラット新生児皮膚の微小創における表皮の創閉鎖にも、ミオシンのリン酸化による細胞の収縮が関与していることが示唆された。

さらに、表皮の創閉鎖が、先端端の基底側に位置する細胞の能動的な運動によることも推測された。

成体皮膚における微小創の治癒様式との相違

これまでの実験は、すべて生後 1 日目の新生児皮膚で行ってきたが、成体皮膚の治癒様式との間に差があるかどうかを検証した。

マッソン・トリクローム染色の結果から、成体ラットの背部皮膚における微小創は、傷つけ後 6 時間までに創部が劇的に拡大し、傷つけ後 18 時間でも創閉鎖が完了しないことが示された（図 12A-D）。また、創周囲表皮は傷つけ後の時間経過とともに肥厚していく様子が観察された。

続いて免疫組織染色をおこなったところ、傷つけ後 6, 12, 18 時間の創周囲表皮で、新生児皮膚のものと同様に細胞の側方面の片側のみで p-MLC の発現が観察された（図 12E-L）。組織染色の結果から、成体皮膚の微小創は傷つけ後 18 時間においても創閉鎖が未完であるため、p-MLC が観察され続けたと推測された。また、K6 は傷つけ後 12 時間以降から創周囲表皮の有棘層以上の細胞で発現がみられ始め、傷つけ後 18 時間で最も強く染色された（未発表）。この抗 K6 抗体染色の結果からは、成体の表皮ケラチノサイトの微小創に対する反応は、新生児皮膚の結果と大きな差がみられなかった。

ROCK を阻害すると創閉鎖は起こらない

ミオシン軽鎖（MLC）のリン酸化を阻害すると創閉鎖が起こらないかどうかを検証するために、ミオシン軽鎖をリン酸化している ROCK の阻害を試みた。ROCK の阻害剤である Y27632 を施創直後の創周囲皮膚に局所的に塗布し、ミオシン軽鎖のリン酸化を阻害したときの微小創の創閉鎖過程を経時的に解析した。

傷つけ後 8 時間では、コントロールも Y27632 の傷もまだ創縁が接着してはいなかった（図 13A, F）。しかし、コントロールの切片は創縁表皮において p-MLC の発現がみられたが、Y27632 を塗布した切片では p-MLC は非常に弱いか、もしくは全く発現がみられなかった（図 13D, I）。傷つけ後 12 時間では、コントロールの切片は表皮の創閉鎖が完了していたにも関わらず、Y27632 を塗布した切片ではまだ創縁表皮の両端が離れたまま、創閉鎖していなかった（図 13B, G）。しかし、Y27632 を塗布した傷つけ後 12 時間の切片では、低頻度ながら創縁表皮で p-MLC を発現し始める傾向がみられた（図 13J）。傷つけ後 18 時間では、Y27632 を塗布した切片でも表皮の創閉鎖が完了

していた (図 13H)。また、全時点において、アクチンと E-カドヘリンの免疫染色については、Y27632 処理群とコントロールとの間に大差はみられなかった (未発表)。Y27632 で創縁の細胞の ROCK を阻害すると、ミオシンのリン酸化が阻害され、表皮の創閉鎖が起こらなかったことから、微小創の創閉鎖にはミオシンによる方向性のある細胞の収縮が重要であることが示唆された。

Rac 1 を阻害しても創閉鎖は起こらない

最後に、Rho A と拮抗し、移動する細胞の前方で活性化され細胞の伸展に関与する Rac 1 を阻害したときに、創閉鎖にどのような影響が出るかを検証した。Rac 1 の阻害剤である NSC23766 を施創直後の創周囲皮膚に局所的に塗布し、微小創の創閉鎖過程を経時的に解析した。

傷つけ後 8 時間では、コントロールも NSC23766 の傷もまだ創閉鎖は完了していなかった (図 14A, F)。ところが、Y27632 を塗布した実験とは異なり、コントロールの切片と NSC23766 を塗布した切片、ともに創縁表皮において p-MLC の発現がみられた (図 14D, I)。傷つけ後 12 時間では、コントロールの切片は表皮の創閉鎖が完了して、p-MLC の発現の減退がみられた (図 14B, E)。しかし、NSC23766 を塗布した切片では、まだ創縁表皮の両端が離れたまま創閉鎖が完了しておらず、さらに p-MLC の発現が消失していた (図 14G, J)。そして、傷つけ後 18 時間では、NSC23766 を塗布した切片でも表皮の創閉鎖が完了していた (図 14H)。また、全時点において、アクチンの免疫染色の結果については、NSC23766 処理群とコントロールとの差はみられなかった (未発表)。以上の結果から、Rac 1 を阻害すると、創閉鎖過程初期の p-MLC の発現はみられるが次第に消失して、切創の創閉鎖は完了しないことが明らかとなった。

考察

新生児ラット皮膚における微小創の創閉鎖過程

本研究の微小創をラット新生児皮膚に施したところ、創縁の表皮シートが急速に接近して接着し、傷つけ後 12 時間以内に創閉鎖が完了した（図 8, 15）。これは、成体ラットに施した微小創や新生児ラットにおける全層切創の創閉鎖（Arai *et al.*, 2013）に所要する時間と比較して迅速であり、表皮シートが真皮の創部表層上を這うように移動する創閉鎖様式もほぼみられなかった。真皮の損傷が小さく、創縁両端の表皮シートが創床を這う程距離が離れていないため、このような形態学的な結果を生じたと推測される。

創縁表皮細胞におけるアクトミオシン系の活性化によって創閉鎖が起こる

微小創の創閉鎖過程において、活性型の p-MLC は、移動している創縁の表皮シートでは各細胞の側方の細胞膜近傍で局在が観察され、創閉鎖後には発現が消失した（図 10, 15）。本研究の光学顕微鏡の解像度では決定的な証拠としては不十分ではあるが（図 10M）、単細胞の運動性に関する先行研究に鑑みると、おそらくこれら p-MLC は各細胞の後方側面に分布し、移動を促進する細胞後方の収縮に寄与していることが推察される（Kolega, 2003; Ridley *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2003; Lee and Treisman, 2004）。このことから、本研究の微小創の創閉鎖でもアクトミオシン系による細胞の移動が関与していることが示唆された。

また、発現する範囲に注目すると、傷つけ後 6 時間における表皮シートでは、基底層と有棘層に位置する、創縁から正常域方向へ 10 個から 20 個離れた細胞までで p-MLC が観察され、傷つけ後 8, 10 時間では、創閉鎖の進行とともに p-MLC の発現はより創縁近傍へ限局していき、創閉鎖が完了した傷つけ後 12 時間では観察されないもしくは創縁の数個の細胞でのみ観察された（図 10, 15）。以上の結果から、創閉鎖の開始時期には、創縁から正常域方向へ 10 から 20 個離れた基底細胞と有棘細胞がアクトミオシン系の活性化によって移動型の形質に転換し、apical 側に位置する顆粒細胞を載せて、なおかつより傷から離れた領域の細胞を牽引する形でシートの状態を保ったまま移動を始める。その後、創閉鎖の完了より前に、傷から離れた領域から徐々に移動能が失われていって正常状態に回復していくというパターンが示された。さらに、この創縁表皮における p-MLC の局在が、施創後に創部が開いた成体皮膚でも観察されたことから、

創床を這うように移動する開放創の創縁表皮でも微小創と同様にアクトミオシン系が活性化されて創閉鎖が起こると推察される。

加えて、成体ラットの微小創でも、創周囲皮膚の張力によって機械的に拡張された創床を移動する表皮において、p-MLC が観察された (図 12)。これは、本実験で新生児に施したような極小さい傷だけでなく、表皮シートが創床を這う過程を含む成体の傷の創閉鎖でも、アクトミオシン系が活性化していることを示している。

続いて、アクトミオシン系を制御する Rho ファミリースモール GTPases の阻害が、表皮の創閉鎖にどのような影響を及ぼすか調べた。アクトミオシン細胞骨格系シグナルを創部局所的に阻害するために、本研究ではいくつかの検討を要した。阻害剤溶液を直接創部皮膚に塗布すると、液体の蒸発によりその効果は持続せず、さりとてコラーゲンゲル等に溶液を染み込ませて湿布すると、創閉鎖がゲルによって物理的に障害を受ける結果となった。また、新生児は母親による保育を必要とすることから、創部を保護するためにオプサイト等で覆う必要があった。そこで、Becker *et al.*, 1999 と Mori *et al.*, 2006 を参照し、Pluronic F-127 と阻害剤溶液の混合溶液を新生児皮膚に塗布する方法を選んだ。Pluronic F-127 は塗布直後から皮膚上でゲル化し始め、コントロールでは創閉鎖への影響を受けることなく、傷つけ後 12 時間まで阻害剤の効果を持続させることができた。*In vivo* において局所的な阻害を行う実験系は少なく、これを成功させた点においても本研究は有意義である。

上述の手法を用いて、ROCK を阻害した場合、おそらく創縁表皮は細胞の後端でミオシン軽鎖を活性化 (リン酸化) できないために移動できず、創閉鎖は起こらなかった (図 13)。一方、Rac 1 を阻害した場合、Rho A の拮抗者が無くなることでミオシン軽鎖の活性化 (リン酸化) は起こるが、おそらく細胞前方でラメリポディアを形成できないためか、もしくは移動の方向性が失われるために、こちらも創閉鎖しなかった (図 14)。これらの阻害実験の結果は、*in vitro* における Rho A や Rac 1 の阻害実験の知見と合致した (Worthylake and Brbridge, 2003; Gao *et al.*, 2004)。本実験の Y27632 及び NSC23766 を塗布した切片において、どちらも傷つけ後 18 時間では創閉鎖が完了した点については (図 13H, 14H)、両阻害剤の作用が可逆的であるために効果が減衰してこのような結果になったと推察した (Rao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004)。以上の本研究の阻害実験の結果は、Rho A と Rac 1 両者とも表皮の創閉鎖には必須であり、Rho A と Rac 1 に依存した表皮自体の能動的な伸展／収縮によって、創閉鎖が遂行されることを示している。

表皮創閉鎖は真皮非依存的な表皮の運動のみでも完結し得る

創閉鎖後において、表皮先端同士が融合した位置の直下の真皮では、時折 blister (水疱) 様の小さな間隙が残された (図 8)。この事実は、表皮の創閉鎖が真皮の閉鎖より先行する傾向があることを意味している。さらに、少なくとも創の大きさが十分小さい場合、表皮細胞はその下に横たわる真皮に依存することなく、それ自身のみによって創閉鎖を遂行しうる可能性を支持する。おそらく表皮細胞には、カドヘリンを介した細胞間接着を維持したまま (第四章参照)、細胞骨格分子や Rho スモール GTPases のような関連因子によって細胞形態や移動を調節することによって創を被覆するという能力が本来備わっているのだろう。

カドヘリンやケラチンの発現パターンの変化は表皮の創閉鎖と関連する

本研究では、微小創の創閉鎖への K6 と P-カドヘリンの寄与を示す直接的な証拠を得ることはできなかった。しかしながら、創閉鎖過程における K6 と P-カドヘリンの発現パターンの変化は、p-MLC の発現パターンの変化と類似であった (図 9)。このことから、K6 や P-カドヘリンの表皮シートの移動への寄与が推測される。

細胞接着分子であるカドヘリンが介在するアドヘレンスジャンクションは上皮シートの形成に重要であり (Adams *et al.*, 1996)、表皮では E-カドヘリンと P-カドヘリンの 2 種のクラシックカドヘリンが発現することが知られている (Hirai *et al.*, 1989; Nose and Takeichi, 1986)。この 2 種のカドヘリンの表皮内局在は異なり (図 9A, G)、先行研究からは傷つけ後の表皮では P-カドヘリンの発現のみ多層に拡大することが示されている (Koizumi *et al.*, 2005)。これらのことから、E-カドヘリンと P-カドヘリンの役割が異なること、そして受創による表皮シートの移動に伴ってカドヘリンの発現が変化することが推測された。

微小創を施した新生児皮膚では、表皮細胞接着分子の P-カドヘリンは、傷つけ後 6 時間の創周囲表皮で発現領域が apical 側へ拡大し、傷つけ後 10 時間以降は傷から離れたところから漸次定常時の染色パターンを回復していった (図 9G-L, 15C)。この傷つけによる P-カドヘリンの発現領域の拡大は、同様に正常表皮では基底層のみで発現するケラチン 14 (K14) の傷つけによる発現領域の拡大と類似であった (未発表)。正常表皮では P-カドヘリンは基底層でのみ発現するため、未分化細胞、もしくは前駆細胞のマーカーであると言われているが (Shimoyama *et al.*, 1989; Paredes *et al.*, 2004; Raymond *et al.*, 2009)、近年の研究では、E-カドヘリンを発現している乳がん細胞で P-カドヘリンを過剰発現させると、細胞の運動性や移動が増加することも示唆されてい

る (Ribeiro *et al.*, 2009; Albergaria *et al.*, 2011)。このことから、傷によって自由端を生じた表皮ケラチノサイトでも、P-カドヘリンを多層で発現することによって、未分化様の形質を獲得しつつ運動性を上げることで表皮シートの移動に寄与している可能性が考えられる。一方で、創閉鎖過程では創縁表皮のシート状の移動がみられたことから、クラシックカドヘリンの発現に変化は生じるが、表皮ケラチノサイト間のアドヘレンスジャンクションの機能は維持されていることが推察できる。

また、新生児の正常皮膚では発現しない上皮特異的中間径線維である K6 は、乾癬や創傷治癒における有棘層で特異的に発現し、正常な表皮では発現しないことが知られている (Weiss *et al.*, 1984; Tyner and Fuchs, 1986; Mansbridge and Knapp, 1987)。傷つけ後 8 時間以降の創縁の表皮で微弱に発現し始めた K6 は、傷つけ後 12 時間以降では強い発現が傷から少し離れた領域にまで拡大した (図 9M-R, 15C)。MT 染色や抗 p-MLC 抗体染色の結果から、傷つけ後 8 時間は創縁表皮シートが移動している時期であり、傷つけ後 12 時間は再表皮化による創閉鎖が完了している時期である (図 8, 10, 15)。最近の研究で、K6 は、皮膚の創傷や腫瘍における表皮ケラチノサイトの移動に関与する Src に結合し、これを調節することで過剰な細胞移動を抑制しているという報告がされている (Rotty and Coulombe, 2012)。以上のことから、本実験において創閉鎖完了以降に強く創部近傍で観察された K6 の染色は、創閉鎖完了前後の時期に創縁表皮の移動を抑制する力が働いていることを示す結果であると推測できる。一方で、我々の研究室で以前におこなった新生児皮膚における直径 2 mm の全層欠損創の創閉鎖の解析結果では、K6 の発現は傷つけ後 6 時間から観察され、創閉鎖の完了は傷つけ後 48 時間以降であった (Koizumi *et al.*, 2004)。本実験で施した微小創との差異は、傷の大きさによって表皮の創閉鎖様式が異なることを示す結果であるとみなした。

新生児と成体での微小創の創閉鎖様式は異なる

微小創を成体ラットに施すと、傷つけ後 18 時間でも創閉鎖には至らなかった (図 12)。これは、新生児と比較して成体では真皮の線維性コラーゲンが発達しているため、それらの収縮により両創縁が遠心方向へ引っ張られて創部が拡張されて、小さな傷にはならなかったと推測される。換言すると、新生児皮膚は真皮の物理的な影響が成体よりも小さく、創閉鎖過程における純粋な表皮の動向を解析するのに有利であると考えられる。上皮治癒様式は個体発生の段階によって異なり、成体と比較して新生児や胎児ではより迅速な創閉鎖が起こることが知られているが、本研究もこれを支持する結果といえる (Burrington, 1971; Dixon, 1960; Ihara *et al.*, 1990; Ihara and Motobayashi, 1992;

Longaker *et al.*, 1990; Martin, 1996; Koizumi *et al.*, 2004)。

過去の多くの研究から、皮膚創傷治癒である再上皮化は、創部及び創周囲の多くの性質が異なる細胞や組織が動員されて相互作用する複雑な過程であると言われている。しかし、その内の表皮創閉鎖という事象に限ると、純粹に表皮のみによる、RhoスモールGTPasesを介したアクトミオシン細胞骨格による能動的な移動だけで説明ができるイベントなのかもしれない。新生児皮膚に微小創を施した本研究は、これを強く示唆する結果となった。

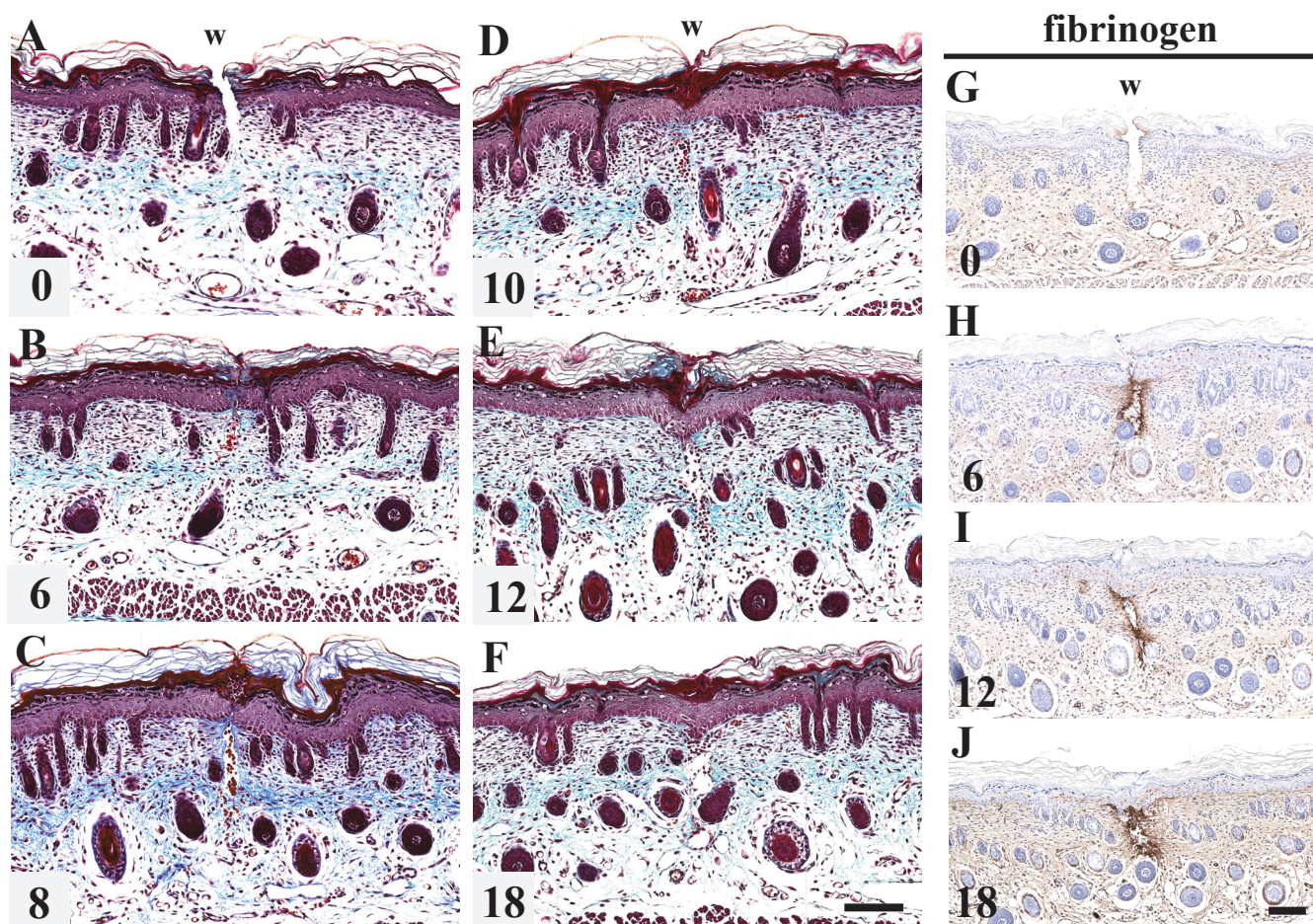


図8 ラット新生児皮膚における微小創の再上皮化過程の形態学的解析

傷つけ後各時間の微小創の垂直切片を作製し、マッソン・トリクローム (MT) 染色をおこなった (A-F)。傷つけ直後の MT 染色像から、本研究で施した浅い切創は、表皮全層と真皮の上部のみを切断し、真皮の下部や皮筋層は無傷のまま残されていることがわかる (A)。傷つけ後 6 時間になると、創縁表皮の先端端が丸みを帯び、その両端は接近した (B)。傷つけ後 8 から 10 時間では、表皮の先端端はさらに創部中央へ移動して相互に接触し (C, D)、傷つけ後 12 時間までに表皮による創閉鎖は完了した (E)。一方、表皮直下の真皮では、創閉鎖後もしばしば間隙が残され (E, F)、傷つけ後 6 時間以降のこの空間では、免疫組織染色でフィブリノゲンの存在が観察された (G-J)。スケールバー, 100 μm ; w, 創; 核染色, ヘマトキシリン。

E-cad

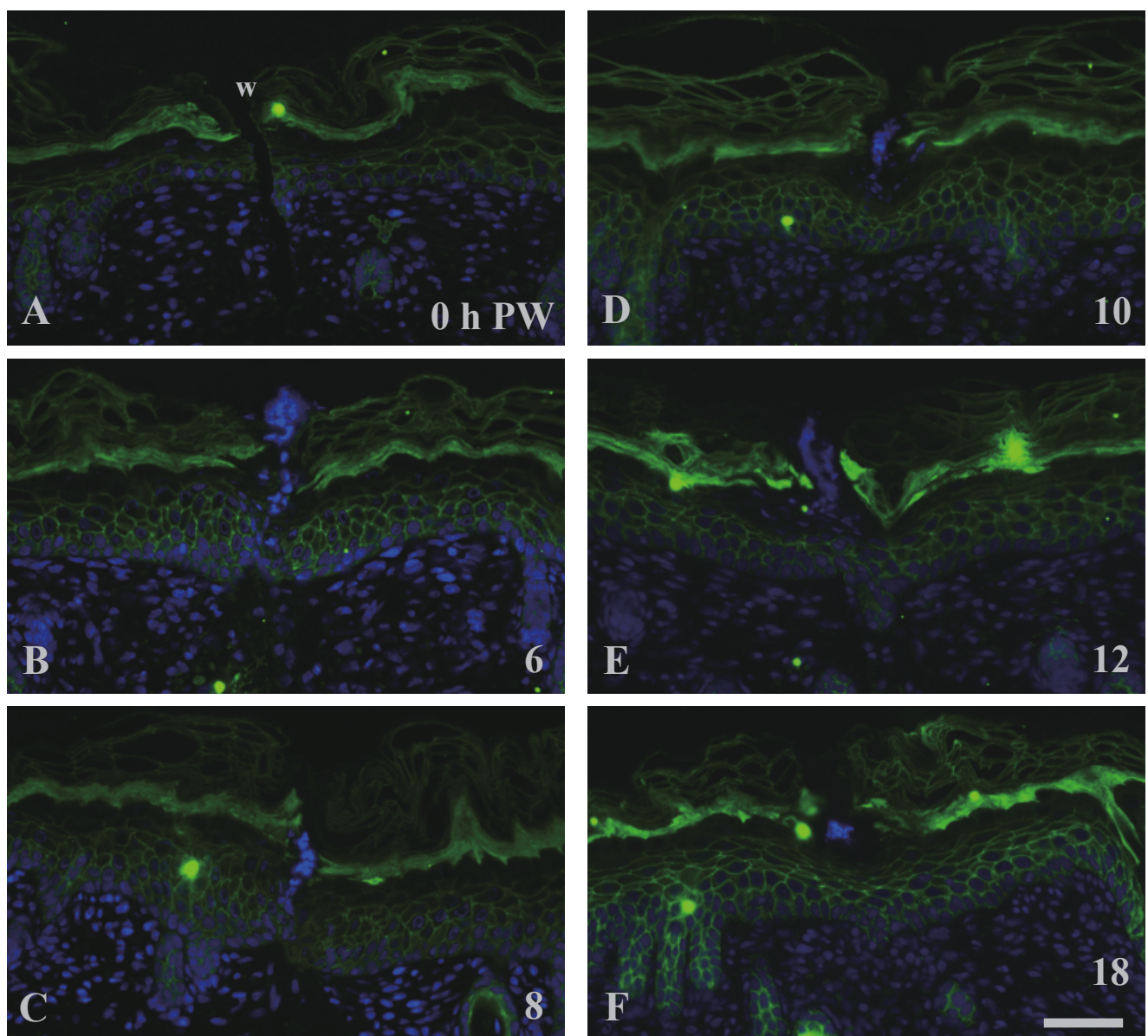


図9 創部表皮におけるカドヘリンとケラチンの局在

P-cad

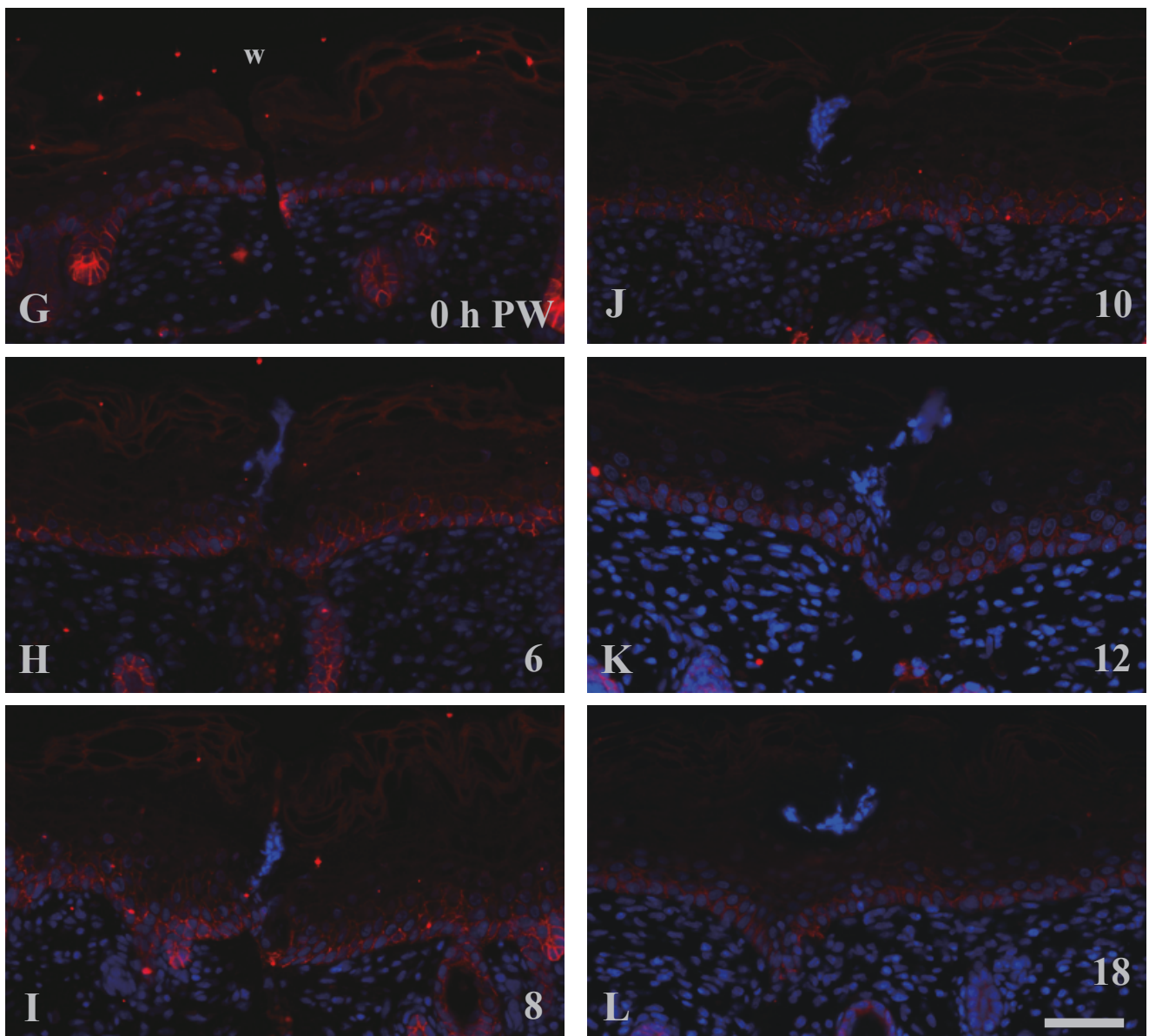


図9 創部表皮におけるカドヘリンとケラチンの局在

K 6

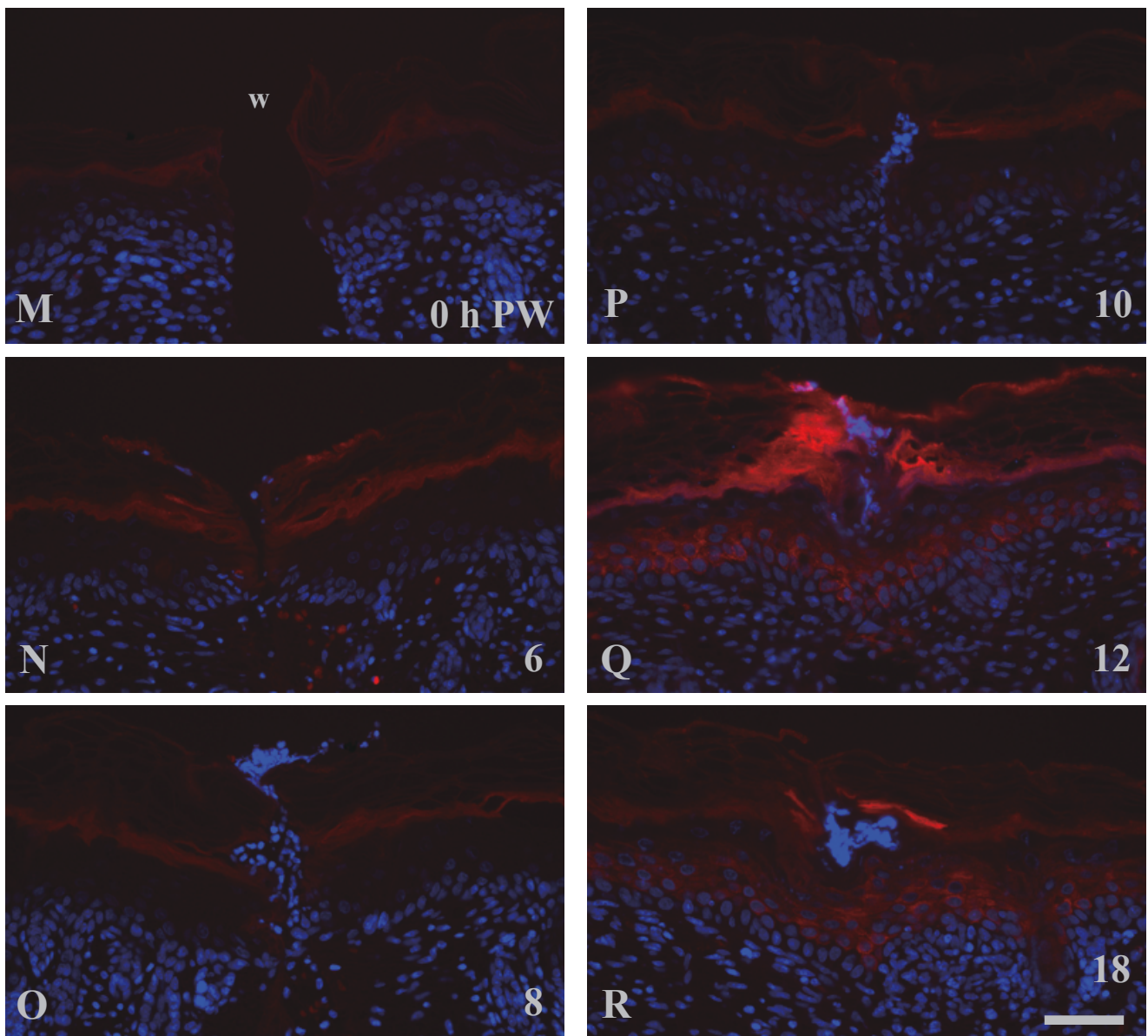


図9 創部表皮におけるカドヘリンとケラチンの局在

E- カドヘリン (A-F), P- カドヘリン (G-L), そしてケラチン 6 (K 6, M-R) を免疫組織染色で検出した。傷つけ直後, E- カドヘリンは有棘層以上, P- カドヘリンは基底層にそれぞれ局在し (A, G), K 6 は検出されなかった (M)。傷つけ後 6 時間では, E- カドヘリンと K 6 は正常な染色パターンを維持していたが (B, N), P- カドヘリンは, 陽性領域が 2 から 4 細胞層上層まで拡張した (H)。傷つけ後 10 時間になると, P- カドヘリンの発現が拡大した領域は, 創縁から 400 μm 以内の範囲に限局された (J)。一方で, この時点から, 創部の有棘層以上において K 6 が発現し始めた (P)。傷つけ後 12 時間までに, P- カドヘリンの分布拡張はさらに創縁へと収束したが (K), 逆に K 6 の分布は, より創部から離れた領域まで広がった (Q)。スケールバー, 50 μm ; w, 創; 核染色, DAPI。

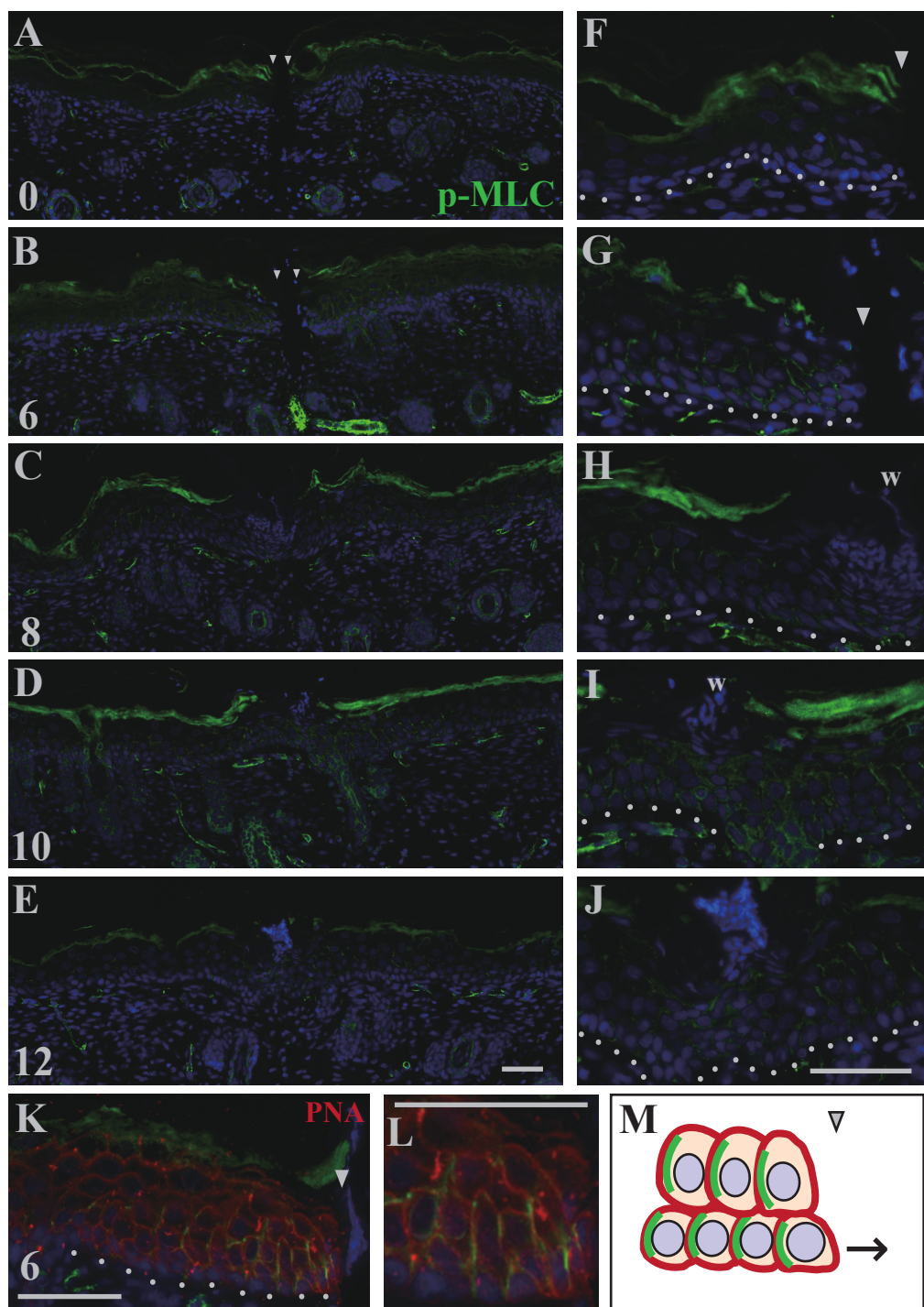


図 10 創閉鎖過程において創部の表皮ケラチノサイトではミオシン II が活性化する

右図 (F-L) は左図 (A-K) の創部を拡大したものである。傷つけ直後の表皮では、活性型ミオシン軽鎖 (p-MLC) は検出されないが (A, F), 傷つけ後 6 時間になると, p-MLC は創縁近傍領域の基底細胞と有棘細胞の, 側方面でみられるようになった (B, G)。傷つけ後 8 から 10 時間では, p-MLC の発現する範囲はしだいに創縁へ限局していき, 傷つけ後 12 時間以降には, 表皮細胞での p-MLC の発現はほぼ消失した (E, J)。p-MLC (緑色) と PNA レクチン (peanut agglutinin, 赤色) の二重染色像から, p-MLC は創縁表皮細胞の細胞膜の側方面の近傍に局在していることが示された (K, L)。この p-MLC は, 既知の事実から, おそらく細胞の後方側面で発現していると考えられる (M)。スケールバー, 50 μm ; 矢尻, 創縁; 核染色, DAPI; 点線, 表皮と真皮の境界。

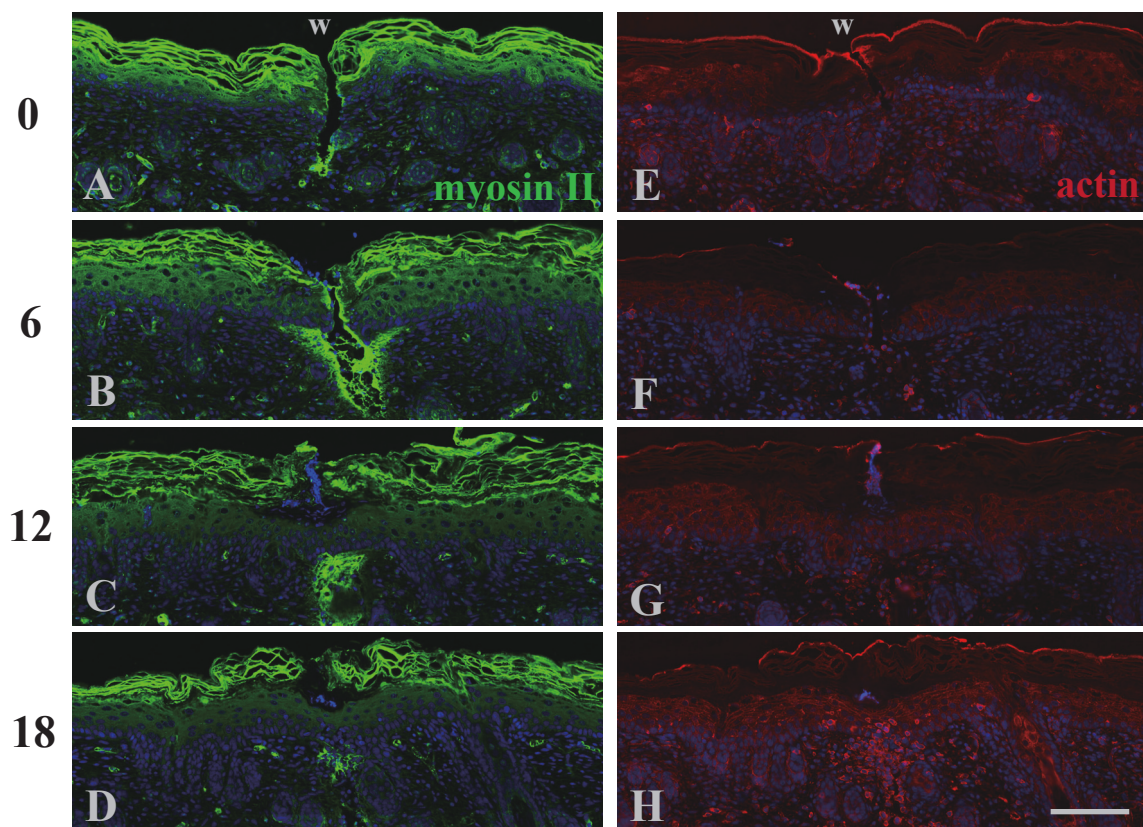


図 1 1 創閉鎖過程においてミオシン II とアクチンの発現はほぼ変化しない
傷つけ後の各時点の切片で、抗 myosin II (A-D)、抗 actin (E-H) 抗体染色をおこなったところ、
両者とも全時点において表皮で観察された。スケールバー, 100 μm ; w, 創 ; 核染色, DAPI。

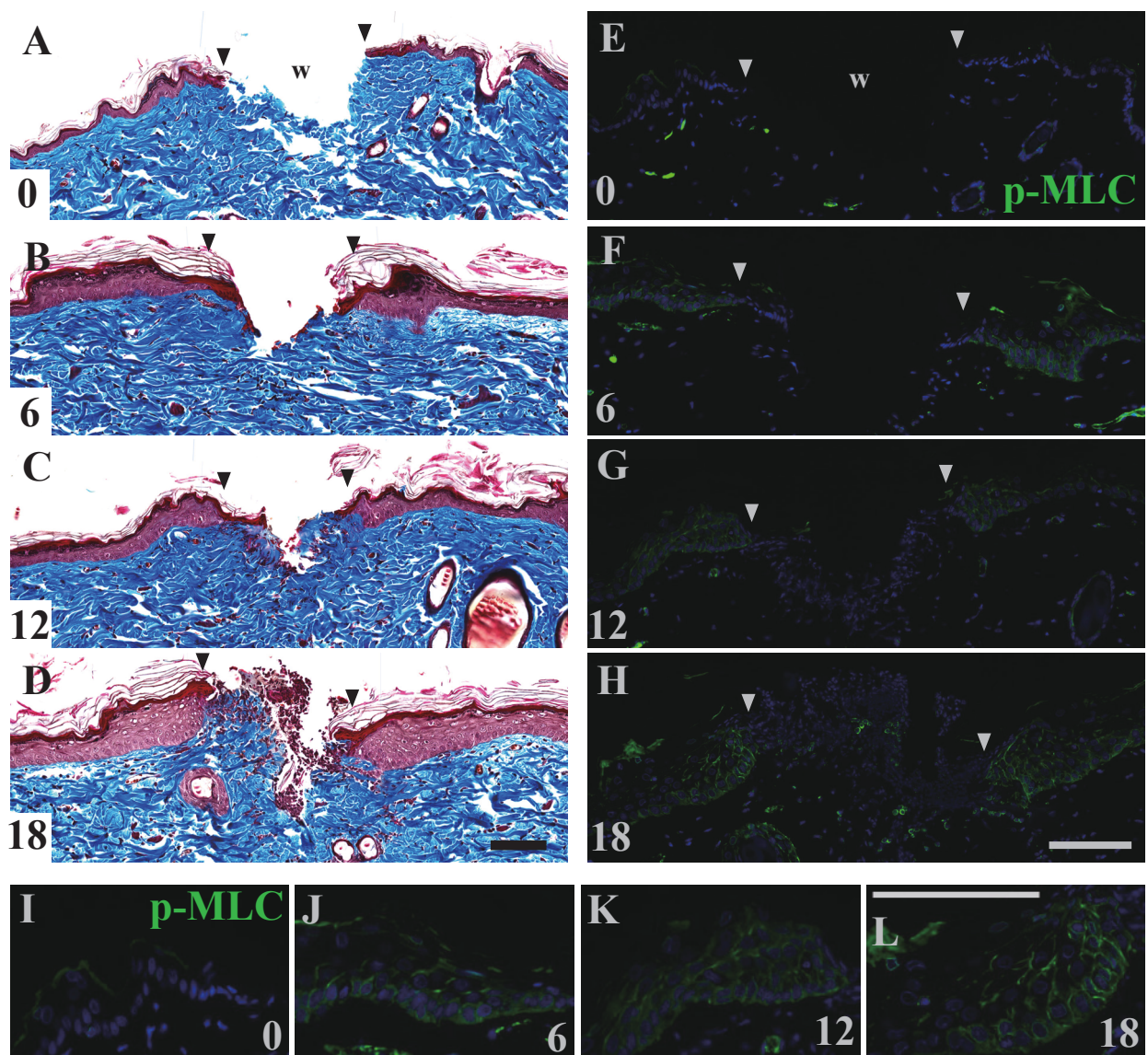


図 1 2 成体ラット皮膚における微小創の創閉鎖

微小創を成体ラットに施し、マッソン・トリクローム染色 (A-D)、抗 p-MLC 抗体染色をおこなった (E-H ; I-L は創縁表皮を拡大したもの)。成体皮膚の微小創は傷つけ後 18 時間でも閉鎖しなかった (D)。一方、p-MLC は傷つけ後 6 から 18 時間の間で創部表皮での分布がみられた (E-H)。スケールバー , 100 μ m ; 矢尻, 創縁 ; 核染色, DAPI。

control

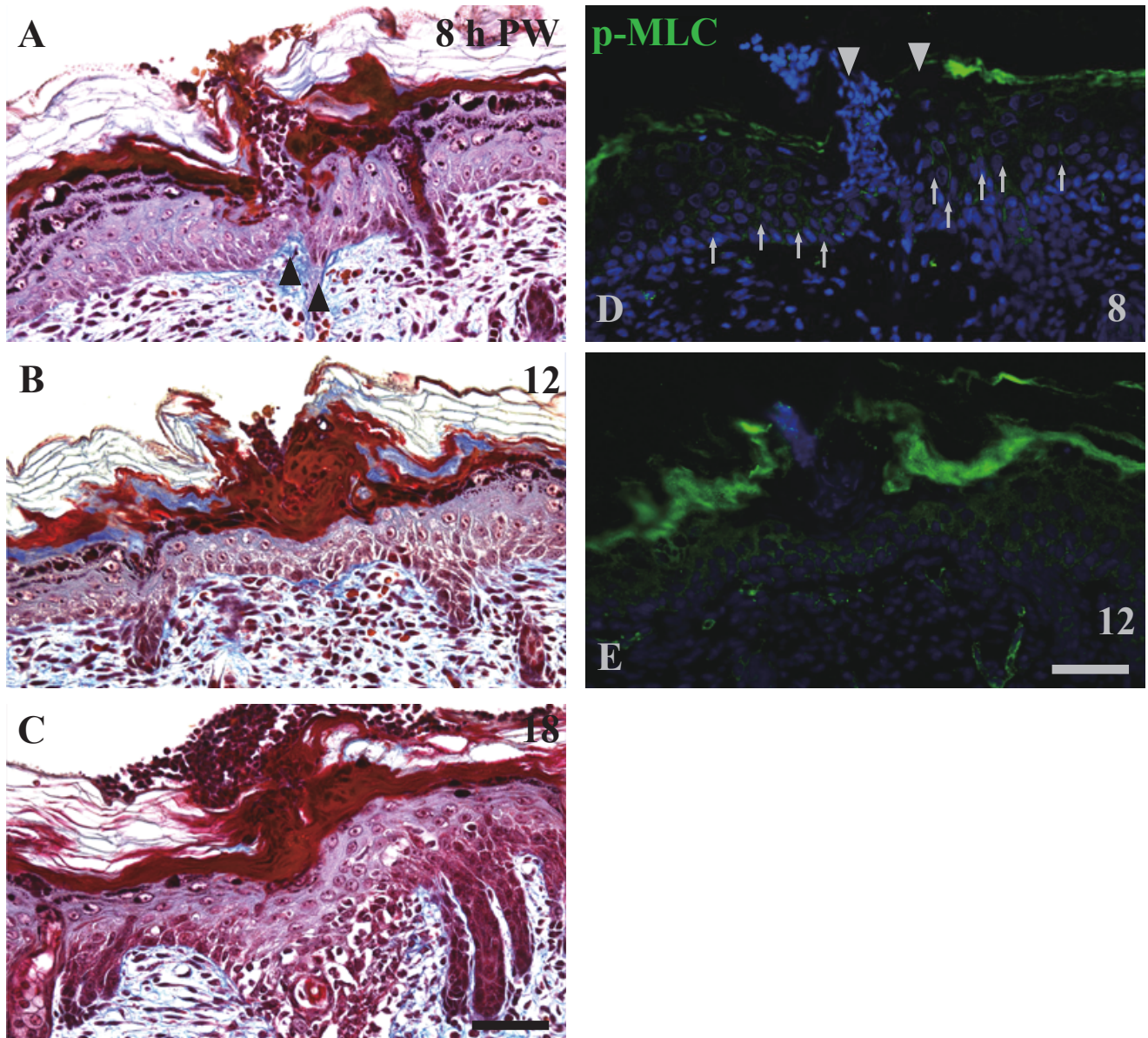


図 1 3 微小創の創閉鎖にはミオシン軽鎖のリン酸化が必須である

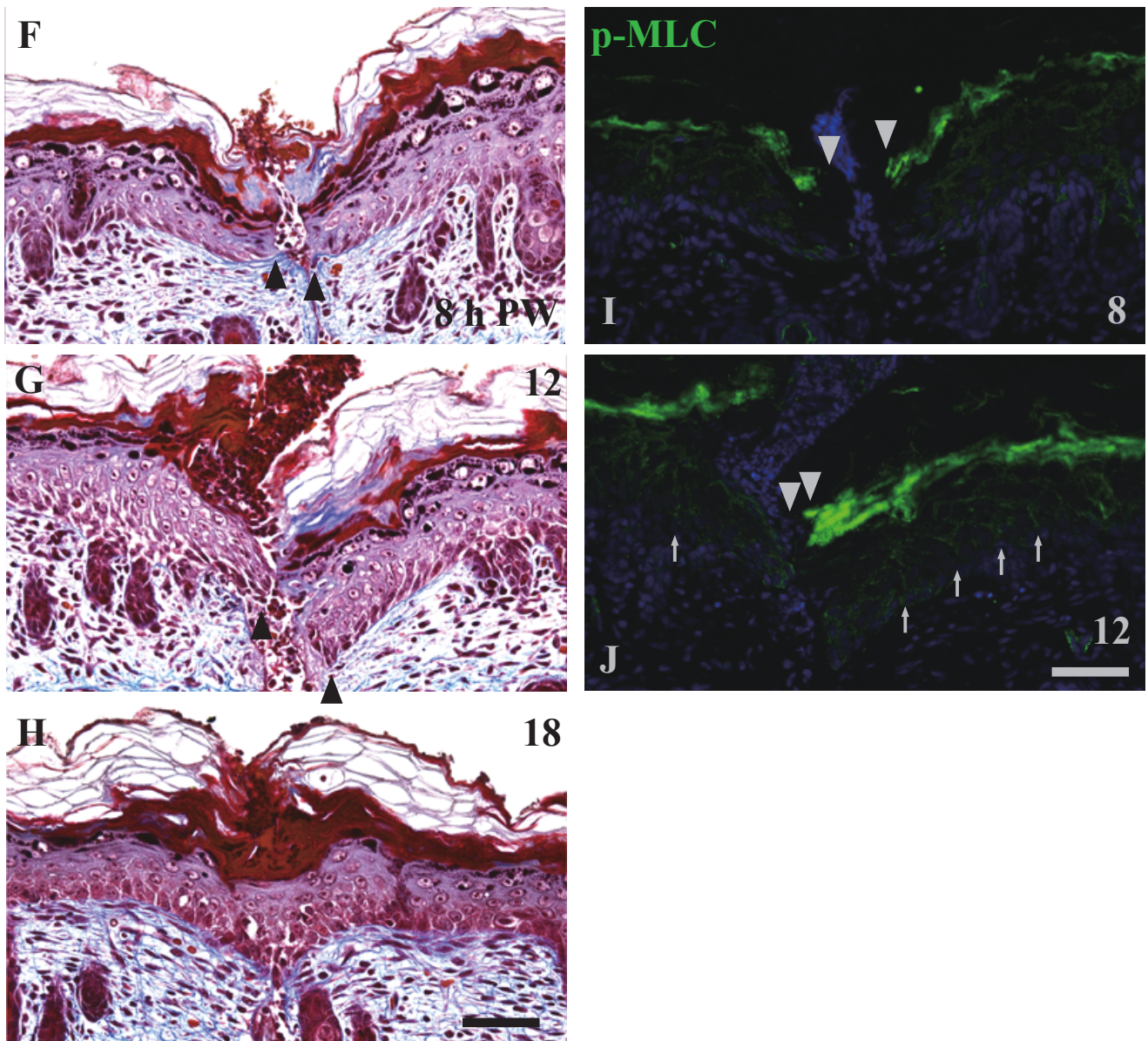


図 1 3 微小創の創閉鎖にはミオシン軽鎖のリン酸化が必須である

右図は ROCK 阻害剤の Y27632 を (F-J)、左図はコントロール溶液を (A-E) 塗布した新生児ラットの微小創の、マッソン・トリクローム染色および抗 p-MLC 抗体染色像を示す。傷つけ後 8 時間では、どちらを塗布した浅い切創もまだ創閉鎖していなかった (A, F)。ところが、コントロールでは p-MLC が確認されたにもかかわらず (D, 矢印)、Y27632 を塗布した創では観察されないか、もしあってもごく弱くしか検出されなかった (I)。傷つけ後 12 時間までに、コントロールの微小創では創閉鎖が完了し (B)、表皮における p-MLC の発現は消失した (E)。特筆すべきことに、Y27632 を塗布した浅い切創は傷つけ後 12 時間でもまだ創は開いたままであり (G)、切片の中には創縁表皮で p-MLC が発現しているものもいくつかあった (J, 矢印)。傷つけ後 18 時間になると、Y27632 を塗布した創でも創閉鎖が完了した (H)。スケールバー, 50 μm ; 矢印, p-MLC ; 矢尻, 創縁 ; 核染色, DAPI。

control

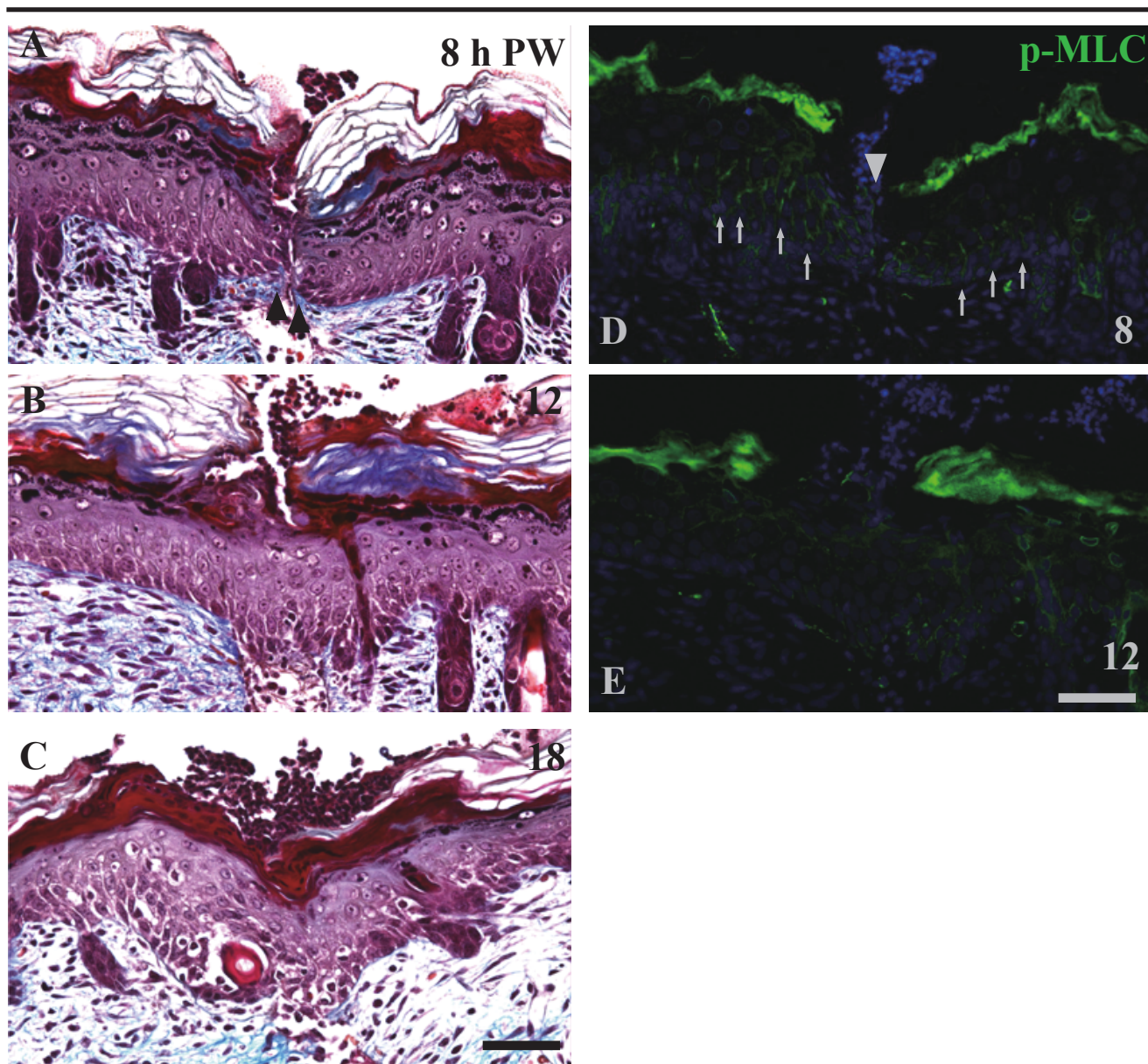


図 1 4 Rac 1 の阻害は創閉鎖を妨げる

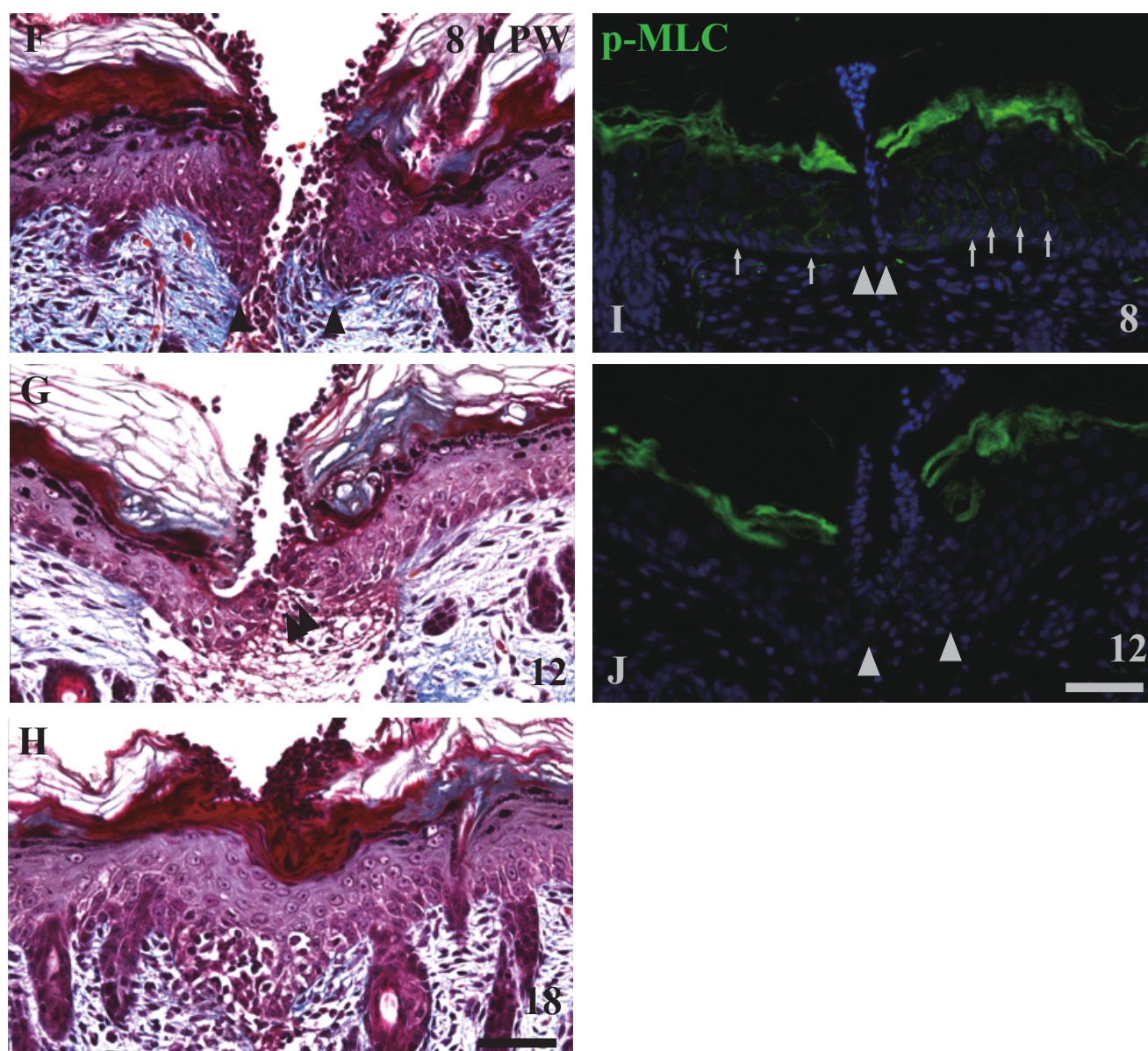


図 1 4 Rac 1 の阻害は創閉鎖を妨げる

右図は Rac1 阻害剤の NSC23766 を (F-J), 左図はコントロール溶液を (A-E) 塗布した新生児ラットの微小創の, マッソン・トリクローム染色および抗 p-MLC 抗体染色像を示す。傷つけ後 8 時間では, どちらを塗布した切片もまだ創閉鎖していなかった (A, F)。そして, Y27632 を塗布した微小創とは異なり (図 13D, I), NSC23766 を塗布した創もコントロールと同様に p-MLC が確認された (D, I, 矢印)。傷つけ後 12 時間では, コントロールでは創閉鎖が完了し (B), 表皮における p-MLC の発現は消失した (E)。一方, NSC23766 を塗布した微小創は, 傷つけ後 12 時間でもまだ創は開いたままであり (G), 傷つけ後 8 時間では発現していた p-MLC が消失した (J)。傷つけ後 18 時間には, NSC23766 を塗布した創でも創閉鎖が完了した (H)。スケールバー, 50 μm ; 矢印, p-MLC; 矢尻, 創縁; 核染色, DAPI。

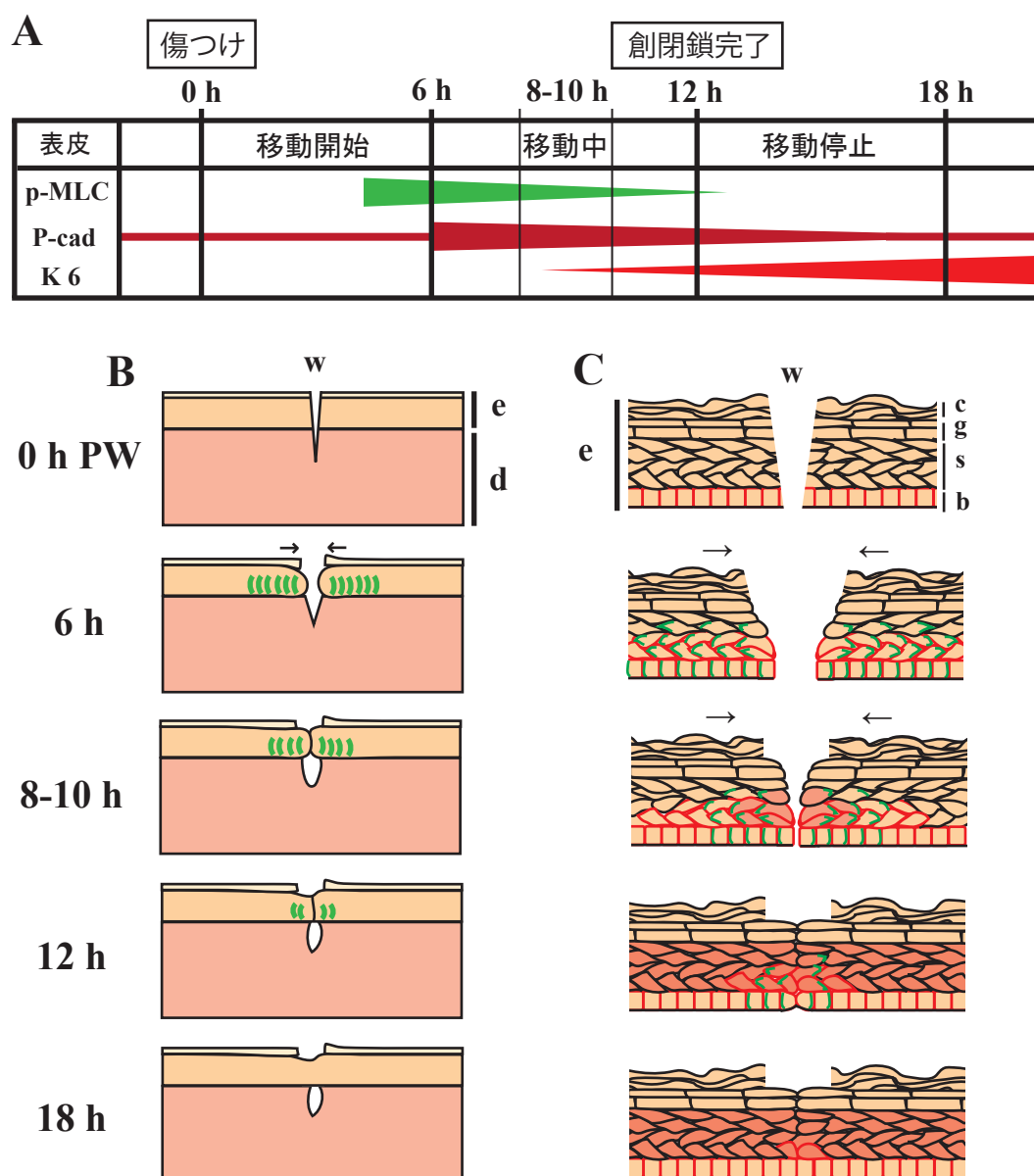


図 1 5 新生児ラットにおける微小創の創閉鎖過程の模式図

A は傷つけ後の p-MLC, P- カドヘリン, および K 6 の発現の経時的変化, B は創閉鎖過程の表皮と真皮, C は創閉鎖過程の表皮部のみを示す。傷つけ直後の表皮は, 正常皮膚と同様に秩序立った層構造を形成している。傷つけ後 6 時間までに, 創縁表皮が創部中央へ向かって移動し始め, 基底細胞と有棘細胞の側方面では p-MLC が発現し, 創部周辺では P- カドヘリンの発現範囲が有棘層まで拡大する。傷つけ後 8 から 10 時間では, 表皮の先端端はさらに創部中央へ移動し, p-MLC および P- カドヘリン陽性の領域は創部近傍のより狭い範囲へ限定されていく一方で, K 6 が創縁から弱く発現し始める。創閉鎖は傷つけ後 12 時間までに完了し, それ以降 (傷つけ後 12, 18 時間), 創傷治癒過程に特異的な (異常な) p-MLC と P- カドヘリンの発現様式は消失するが, K 6 はより強く, 創部からより離れた領域にわたり発現するようになる。e, 表皮; d, 真皮; b, 基底細胞層; s, 有棘細胞層; g, 顆粒細胞層; c, 角質層; w, 創; 矢印, 表皮の進行方向; 緑線, p-MLC の発現; 赤枠, P- カドヘリンの発現; 赤色細胞, K 6 陽性細胞。

第四章

総合考察

1. 新生児ラット皮膚切創の再上皮化過程の形態学的知見

本研究は、皮膚切創の再上皮化における新しい見解を示した。新生児ラットの背部皮膚に切創を施すと、傷つけ後数時間で創縁表皮細胞は性質や形態を変化させ、シート状態を保ったまま創部中央への移動を開始する。この創縁表皮シートの移動の原動力は、細胞間接着を維持した個々の細胞におけるアクトミオシン細胞骨格系の活性化であることが示唆された。続いて、表皮シートの先端端同士が創部中央で接触、結合して創閉鎖が完了すると、表皮は基底側へ向かって肥厚し始める。その後、創部表皮は肥厚が極大に達すると、一転して薄化し始める。この創部表皮の肥厚化と薄化は、表皮ケラチノサイトの分化機構の変動が大きな要因であることが示唆された。そして、創部表皮は薄化によって正常部と同様の厚さに回復し、再上皮化は完了する。

2. 創部表皮の肥厚、薄化を経た正常状態への回復

第二章では、創閉鎖後の創部表皮の厚さの変化について解析した。新生児皮膚の全層切創は傷つけ後 48 時間までに創閉鎖した後、創部表皮は肥厚し始め、傷つけ後 96 時間で厚さはピークに達した。肥厚した創部表皮はその後薄化し始め、傷つけ後 192 時間には正常時の厚さに回復した。創閉鎖後の表皮についての研究はほとんどなされていないことから、この創部表皮の厚さが変動する原因を解明したいと考えた。

本研究では、まず、肥厚した創部表皮が薄化する現象について説明する手がかりを得た。創部表皮の厚さの変動と表皮細胞数の変動の間に相関があり得ると考えた著者は、細胞増殖やアポトーシス、オートファジー等について免疫組織化学的手法を用いて解析した。すると、創部表皮が薄化している傷つけ後 120 時間において TUNEL 陽性細胞の割合が増加することが示された。このことから、当初は肥厚した表皮が薄くなる原因は、アポトーシスによる表皮細胞数の減少であると考えた。しかし、同じ細胞死ではあるが表皮ケラチノサイト特有の細胞死である角質化 (cornification) を示している可能性が浮上した。第二章の考察でも述べたように、表皮の顆粒層では角質化する際に TUNEL 陽性細胞が観察されることが知られている (McCall and Cohen, 1991)。本研

究においても、正常域の表皮でも一定数の TUNEL 陽性細胞が観察されたこと（未発表）、さらに、薄化する創部表皮でも TUNEL 陽性細胞は表皮の上層でしかみられないことから、TUNEL 陽性細胞の増加は角質化の増加、促進を示しているのではないかと考えるに至った。

そして、ケラチノサイト分化マーカータンパク質の解析から、過度に増加した表皮ケラチノサイトが減少する機構、つまり肥厚した表皮が薄化する機構には、終末分化速度の変動や角質化の亢進が関与していることが示唆された。整然と並んだ細胞が規則正しく層構造を形成している表皮における終末分化の乱れは、特筆すべきことである。しかし、本研究結果では表皮細胞層の 1 層分の変化しかみられなかった。果たして、わずかに 1 層分の変化のみで、24 時間という限られた時間内に起こるダイナミックな表皮の厚さの変動を説明しきることができるのだろうか。何か他の要因もあると推測できる。

一方、創閉鎖後の創部表皮が肥厚する仕組みは、本研究では明らかにならなかった。原因としては、創閉鎖後もしばらく表皮シートの移動が停止せずにオーバーランしてしまうこと、または創閉鎖後、創部表皮ケラチノサイトの細胞増殖が再開した際に一時的に過増殖になることが考えられた。しかし、傷の大きさは異なるが、第三章では創閉鎖完了後の傷つけ後 12 時間には細胞の移動を示す p-MLC の発現が弱まり限局され、傷つけ後 18 時間では消失したことから、表皮シートのオーバーランは考え難い。過増殖についても、第二章の BrdU の解析からは大きな変動がみられず、こちらも原因とは断定できず、今後の更なる検討を必要とする。

この他にも、創部表皮の厚さの変動には様々な要因があると考えられる。著者の以前の研究から、切片のレクチン染色像では、肥厚時の創部表皮の有棘層と顆粒層に位置する細胞は正常時と比較してサイズが大きいものが多く観察された（未発表）。このことから、創部の表皮ケラチノサイトの個々の細胞サイズの変化も、表皮組織の厚さの変動に関与していることが推測される。

また、正常な皮膚では表皮の下には強靱な真皮が裏打ちしているが、皮膚の創傷治癒過程では表皮創閉鎖直後の創部真皮は脆弱であり、再構成までにはさらに時間を要する。創部表皮の下に細胞が進出しやすい空間ができ、その後、産生されたコラーゲン等によって満たされ埋められ、表皮は押し上げられること、このことも創部表皮の肥厚や薄化に関係しているのかもしれない。

3. 皮膚切創の創閉鎖とアクトミオシン細胞骨格

第三章では、表皮による創閉鎖を形態学的に解析した。微小創では、傷つけ後 6 時間

で創縁表皮細胞において p-MLC の局在が観察されたことから、この時点では表皮シートが移動を開始していることが示された。

細胞後方で収縮のためにミオシンを活性化するシグナルと、細胞前方で葉状仮足を形成するアクチン重合を促進するシグナルは、相互に阻害し合うことが知られている (Chauhan *et al.*, 2009)。本研究では、そのどちらを阻害しても創閉鎖は完了しないという結果になった。ただし、p-MLC の発現に関してはふたつの阻害実験間で差異が生じ、ROCK の阻害では p-MLC は発現せず、一方の Rac 1 の阻害では傷つけ後 8 時間ではみられた p-MLC が創閉鎖していない 12 時間後では消失した (第三章)。Rac 1 の阻害によってより強化されるはずの Rho A シグナル経路が、時間を経ると逆に抑制された原因は何であろうか。本研究では証拠は得られていないが、負のフィードバックが働いた可能性が考えられる。

また、アクトミオシン細胞骨格系は細胞接着を制御していることが知られている (Noren *et al.*, 2001, Braga and Yap, 2005, Shewan *et al.*, 2005,)。近年、ROCK やミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)、ミオシン II ATPase 活性を阻害すると E-カドヘリンの接着強度が低下すること、そしてカドヘリンとインテグリン間にはクロストークが存在することから、アクトミオシン細胞骨格系が細胞間、細胞-基質間の接着強度のコントロールに関与していることが示唆されている (Martinez-Rico *et al.*, 2010)。以上のことから、本研究で注目したミオシン軽鎖のリン酸化は、創閉鎖において細胞移動だけでなく細胞接着も調節制御している可能性が考えられる。第三章では、創閉鎖過程において E-カドヘリンの染色強度は変化がみられなかったが、接着強度は変化しているのかもしれない。他にも、本研究で示した P-カドヘリン発現の変化や K6 ケラチンの出現など、表皮ケラチノサイトにおける様々な分子の変化によって、創閉鎖は遂行されることが推察される。

4. 発生と創傷治癒

過去の研究から、上皮治癒様式は、個体発生の段階によって異なることが知られている (Burrington, 1971; Dixon, 1960; Ihara *et al.*, 1990; Longaker *et al.*, 1990; Martin, 1996; Koizumi *et al.*, 2004)。本研究においても、新生児皮膚の再上皮化は成体皮膚と比較して早急であったことなど、発生段階の違いが原因とみられる差異が観察された。第三章において、この新生児と成体間における創閉鎖速度の差は、真皮の発達状況の差に因るものではないかと考察した。

しかし、それぞれの表皮における違いが皆無であるわけではない。表皮細胞層の厚さ

は、新生児期がもっとも厚く、成長過程で薄くなっていくことが知られている。生後 1 日目新生児の表皮は、成体と比べて甚だ多層であり、生後 7 日目（傷つけ後 144 時間）の HE 染色画像をみると、生後 1 日目よりも細胞層数が減少していることがわかる（第二章）。この発生過程における表皮の厚さの変化と、本研究で解析した再上皮化過程における創部表皮の厚さの変化の間には、同じような機構が働いている可能性が考えられる。また、表皮細胞層が薄くなった成体皮膚では、かわりに真皮が厚く発達している。このことから、真皮が表皮の厚さの変化に影響を与えていることも推測される。

5. 終わりに

近年、創閉鎖や細胞移動、細胞分化についての研究は、より単純化された *in vitro* の実験系で解析されることが多い。標的とする分子や細胞を絞り、それらの機序や機能、動態を研究するためには、外的要因を極力排除できる *in vitro* 系は優れた実験手段であるといえる。しかし、実際の生物は多種多様な細胞や分子によって構成され、それらが複雑に相互作用している。*in vivo* の実験系である本研究は、実際の生物で起きている事象を形態学的に解析した点においても意義あるものとなった。今後、分子生物学的手法等も用いて、表皮ケラチノサイトの性質の変化を時間的、空間的により詳しく解析することによって、創傷治癒ならびに再上皮化研究がより発展していくことが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、島根大学生物資源科学部 猪原 節之介 名誉教授に深く感謝いたします。長年、研究や科学的議論、論文執筆においてご指導いただいたのみならず、研究に対する真摯な態度、純粋な好奇心や情熱を持ち続けることの大切さをご教授いただいたことを、心より御礼申し上げます。島根大学生物資源科学部 松崎 貴 教授には、論文共著者としてセミナーや研究過程において有意義なご助言と議論を賜りましたことに厚く感謝申し上げます。さらに、島根大学生物資源科学部 生物科学科の諸先生にも、講義や実習を通じて生物学の面白さや幅広い知見をご教示いただき、感謝申し上げます。

また、形態形成グループの学生諸氏には、研究活動の様々な面で多くのサポートをいただきましたことに御礼申し上げます。

引用文献

- C. L. Adams, W. J. Nelson, and S. J. Smith, "Quantitative analysis of cadherin-cadherin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 135, No. 6, Pt 2, 1996, pp.1899-1911.
- C. Agarwal, T. Efimova, J. F. Welter, J. F. Crish, and R. L. Eckert, "CCAAT/Enhancer-Binding Proteins. A Role in Regulation of Human Involucrin Promoter Response to Phorbol Ester," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 10, 1999, pp. 6190-6194.
- A. Albergaria, A. S. Ribeiro, A. F. Vieira, B. Sousa, A. R. Nobre, R. Seruca, F. Schmitt, and J. Paredes, "P-Cadherin Role in Normal Breast Development and Cancer," *The International Journal of Developmental Biology*, Vol. 55, No. 7-9, 2011, pp. 811-822.
- L. Alibardi, E. Tschachler, and L. Eckhart, "Distribution of Caspase-14 in Epidermis and Hair Follicles is Evolutionarily Conserved among Mammals," *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, Vol. 286, No. 2, 2005, pp. 962-973.
- M. Arai, T. Matsuzaki, and S. Ihara, " Wound Closure on the Neonatal Rat Skin I. The Modulation of the Thickness of Epidermis at the Closing Incisional Wounds," *CellBio*, Vol. 2, No. 4, 2013, pp. 248-256.
- S. H. Baek, Y. C. Kwon, H. Lee, and K. M. Choe, "Rho-Family Small GTPases are Required for Cell Polarization and Directional Sensing in Drosophila Wound Healing," *Biochemical and Biophysical research Communications*, Vol. 394, No. 3, 2010, pp. 488-492.
- D. L. Becker, I. McGonnell, H. P. Makarenkova, K. Patel, C. Tickle, J. Lorimer, and C. R. Green, "Roles for Alpha 1 Connexin in Morphogenesis of Chick Embryos Revealed Using a Novel Antisense Approach," *Developmental Genetics*, Vol. 24, No. 1-2, 1999, pp. 33-42.

- V. M. Braga and A. S. Yap, "The Challenges of Abundance: Epithelial Junctions and Small GTPase Signalling," *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17, Issue. 5, 2005, pp. 466-474.
- J. Brock, K. Midwinter, J. Lewis, and P. Martin, "Healing of Incisional Wounds in the Embryonic Chick Wing Bud: Characterization of the Actin Purse-String and Demonstration of a Requirement for Rho Activation," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 135, No. 4, 1996, pp.1097-1107.
- K. Burridge and K. Wennerberg, "Rho and Rac Take Center Stage," *Cell*, Vol. 116, No. 2, 2004, pp. 167-179.
- J. D. Burrington, "Wound Healing in the Fetal Lamb," *Journal of Pediatric Surgery*, Vol. 6, No. 5, 1971, pp.523-528.
- C. Byrne, M. Tainsky, and E. Fuchs, "Programming Gene Expression in Developing Epidermis," *Development*, Vol. 120, No. 9, 1994, pp. 2369-2383.
- B. K. Chauhan, M. Lou, Y. Zheng, and R. A. Lang, "Balanced Rac1 and RhoA Activities Regulate Cell Shape and Drive Invagination Morphogenesis in Epithelia," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Vol. 108, No. 45, 2011, pp. 18289-18294.
- B. H. Chen, J. T. Tzen, A. R. Bresnick, and H. C. Chen "Roles of Rho-Associated Kinase and Myosin Light Chain Kinase in Morphological and Migratory Defects of Focal Adhesion Kinase-Null Cells," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 3, 2002, pp. 33857-33863.
- R. A. Clark, "Fibrin and Wound Healing," *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 936, 2001, pp. 355-367.
- R. A. Clark, K. Ghosh, and M. G. Tonnesen, "Tissue Engineering for Cutaneous Wounds," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 127, No. 5, 2007, pp. 1018-1029.
- G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq, "Caspase-14 Reveals Its Secrets," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 180, No. 3, 2008, pp. 451-458.
- J. B. Dixon, "Inflammation in the Foetal and Neonatal Rat: the Local Reactions to Skin Burns," *The Journal of Pathology and Bacteriology*, Vol. 80, 1960, pp.73-82.
- R. L. Eckart J. F. Crish, T. Efimova, S. R. Dashti, A. Deucher, F. Bone, A. Gautam, H. Guosheng, G. Ramamurthy, and B. Sivaprakasam, "Regulation of Involucrin

- Gene Expression," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 123, No. 1, 2004, pp. 13-22.
- L. Eckhart and E. Tschachler, "Cuts by Caspase-14 Control the Proteolysis of Filaggrin," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 131, No. 11, 2011, pp. 2173-2175.
- E. Fuchs, "Keratins and the Skin," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 11, 1995, pp.123-154.
- E. Fuchs, "Skin Stem Cells: Rising to the Surface," *The Journal Cell Biology*, Vol. 180, No. 2, 2008, pp. 273-284.
- E. Fuchs and V. Horsley, "More than One Way to Skin," *Genes & Development*, Vol. 22, No. 8, 2008, pp.976-985.
- M. Fukata, M. Nakagawa, and K. Kaibuchi, "Roles of Rho-Family GTPases in Cell Polarisation and Directional Migration," *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 15, No. 5, 2003, pp. 590-597.
- Y. Gao, J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng, "Rational Design and Characterization of a Rac GTPase-Specific Small Molecule Inhibitor," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Vol. 101, No. 20, 2004, pp. 7618-7623.
- T. Hibino, E. Fujita, Y. Tsuji, J. Nakanishi, H. Iwaki, C. Katagiri, and T. Momoi, "Purification and Characterization of Active Caspase-14 from Human Epidermis and Development of the Cleavage Site-Directed Antibody," *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 109, No. 3, 2010, pp. 487-497.
- Y. Hirai, A. Nose, S. Kobayashi, and M. Takeichi, "Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis," *Development*, Vol. 105, No. 2, 1989, pp. 271-277.
- E. Hoste, P. Kemperman, M. Devos, G. Denecker, S. Kezic, N. Yau, B. Gilbert, S. Lippens, P. De Groote, R. Roelandt, P. Van Damme, K. Gevaert, R. B. Presland, H. Takahara, G. Puppels, P. Caspers, P. Vandenabeele, and W. Declercq, "Caspase-14 is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 131, No. 11, 2011, pp. 2233-2241.
- K. H. Hyun, M. Nakai, K. Kawamura, and M. Mori, "Histochemical Studies of Lectin Binding Patterns in Keratinized Lesions, Including Malignancy,"

- Virchows Archive. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, Vol. 402, No. 4, 1984, pp. 337-351.
- S. Ihara, Y. Motobayashi, E. Nagao, and A. Kistler, "Ontogenetic Transition of Wound Healing Pattern in Rat Skin Occurring at the Fetal Stage," *Development*, Vol. 110, No. 3, 1990, pp.671-680.
- S. Ihara, and Y. Motobayashi, "Wound Closure in Foetal Rat Skin," *Development*, Vol. 114, No. 3, 1992, pp.573-582.
- P. F. Johnson, "Molecular Stop Signs: Regulation of Cell-Cycle Arrest by C/EBP Transcription Factors," *Journal of Cell Science*, Vol. 118, 2005, pp. 2545-2555.
- M. Koizumi, T. Matsuzaki, and S. Ihara, "The Subsets of Keratinocytes Responsible for Covering Open Wounds in Neonatal Rat Skin," *Cell and Tissue Research*, Vol. 315, No. 2, 2004, pp.187-195.
- M. Koizumi, T. Matsuzaki, and S. Ihara, "Expression of P-cadherin Distinct from That of E-Cadherin in Re-Epithelialization in Neonatal Rat Skin," *Development, Growth & Differentiation*, Vol. 47, No. 2, 2005, pp.75-85.
- J. Kolega, "Asymmetric Distribution of Myosin IIB in Migrating Endothelial Cells is Regulated by a Rho-Dependent Kinase and Contributes to Tail Retraction," *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14, No. 12, 2003, pp. 4745-4757.
- M. I. Koster, and D. R. Roop, "Mechanisms Regulating Epithelial Stratification," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 23, 2007, pp.93-113.
- A. Lee, and J. E. Treisman, "Excessive Myosin Activity in Mbs Mutants Causes Photoreceptor Movement Out of the Drosophila Eye Disc Epithelium," *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 15, No. 11, 2004, pp. 3285-3295.
- E. R. Li, D. M. Owens, P. Djian, and F. M. Watt, "Expression of Involucrin in Normal, Hyperproliferative and Neoplastic Mouse Keratinocytes," *Experimental Dermatology*, Vol. 9, No. 6, 2000, pp. 431-438.
- S. Lippens, M. Kockx, M. Knaapen, L. Mortier, R. Polakowska, A. Verheyen, M. Garmyn, A. Zwijsen, P. Formstecher, D. Huylebroeck, P. Vandenabeele, and W. Declercq, "Epidermal Differentiation Does Not Involve the Pro-Apoptotic Executioner Caspases, but is Associated with Caspase-14 Induction and Processing," *Cell Death and Differentiation*, Vol. 7, No. 12, 2000, pp. 1218-1224.
- S. Lippense, G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq, "Death

- Penalty for Keratinocytes: Apoptosis Versus Cornification,” *Cell Death and Differentiation*, Vol. 12, 2005, pp. 1497-1508.
- M. T. Longaker, D. J. Whitby, N. S. Adzick, T. M. Crombleholme, J. C. Langer, B. W. Duncan, S. M. Bradley, R. Stern, M. W. Ferguson, and M. R. Harrison, “Studies in Fetal Wound Healing, VI. Second and Early Third Trimester Fetal Wounds Demonstrate Rapid Collagen Deposition without Scar Formation,” *Journal of Pediatric Surgery*, Vol. 25, No. 1, 1990, pp.63-68; discussion 8-9.
- J. N. Mansbridge, and A. M. Knapp, “Changes in Keratinocyte Maturation during Wound Healing,” *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 89, No. 3, 1987, pp. 253-263.
- P. Martin, “Mechanisms of Wound Healing in the Embryo and Fetus,” *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 32, 1996, pp.175-203.
- P. Martin, and S. M. Parkhurst, “Parallels between Tissue Repair and Embryo Morphogenesis,” *Development*, Vol. 131, No. 13, 2004, pp. 3021-3034.
- C. Martinez-Rico, F. Pincet, J. P. Thiery, and S. Dufour. “Integrins Stimulate E-Cadherin-Mediated Intercellular Adhesion by Regulating Src-Kinase Activation and Actomyosin Contractility,” *Journal of Cell Science*, Vol. 123, Pt 5, 2010, pp. 712-22.
- E. V. Maytin, J. C. Lin, R. Krishnamurthy, N. Batchvarova, D. Ron, P. J. Mitchell, and J. F. Habener, “Keratin 10 Gene Expression during Differentiation of Mouse Epidermis Requires Transcription Factors C/EBP and AP-2,” *Developmental Biology*, Vol. 216, No. 1, 1999, pp. 164-181.
- C. A. McCall and J. J. Cohen, “Programmed Cell Death in Terminally Differentiating Keratinocytes: Role of Endogenous Endonuclease,” *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 97, No. 1, 1991, pp. 111-114.
- R. Mori, K. T. Power, C. M. Wang, P. Martin, and D. L. Becker, “Acute Downregulation of Connexin43 at Wound Sites Leads to a Reduced Inflammatory Response, Enhanced Keratinocyte Proliferation and Wound Fibroblast Migration,” *Journal of Cell Science*, Vol. 119, No. 6, 2006, pp. 5193-5203.
- A. S. Nimnual, L. J. Taylor, and D. Bar-Sagi, “Redox-Dependent Downregulation of Rho by Rac,” *Nature Cell Biology*, Vol. 5, No. 3, 2003, pp. 236-241.

- N. K. Noren, C. M. Niessen, B. M. Gumbiner, and K. Burridge, "Cadherin engagement regulates Rho family GTPases," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 36, 2001, pp. 33305-8.
- A. Nose and M. Takeichi, "A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 103, No. 6, Pt 2, 1986, pp. 2649-2658.
- H. S. Oh and R. C. Smart, "Expression of CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP) is Associated with Squamous Differentiation in Epidermis and Isolated Primary Keratinocytes and is Altered in Skin Neoplasms," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 110, No. 6, 1998, pp. 939-945.
- J. Paredes, C. Stove, V. Stove, F. Milanezi, V. Van Marck, L. Derycke, M. Mareel, M. Bracke, and F. Schmitt, "P-Cadherin is Up-Regulated by the Antiestrogen ICI 182,780 and Promotes Invasion of Human Breast Cancer Cells," *Cancer Research*, Vol. 64, No. 22, 2004, pp. 8309-8317.
- S. Pellegrin and H. Mellor, "Actin Stress Fibres," *Journal of Cell Science*, Vol. 120, No. Pt 20, 2007, pp. 3491-3499.
- R. B. Presland, M. K. Kuechle, S. P. Lewis, P. Fleckman, and B. A. Dale, "Regulated Expression of Human Filaggrin in Keratinocytes Results in Cytoskeletal Disruption, Loss of Cell-Cell Adhesion, and Cell Cycle Arrest," *Experimental Cell Research*, Vol. 270, No. 2, 2001, pp. 199-213.
- E. Proksch, J. M. Brandner, and J. M. Jensen, "The Skin: an Indispensable Barrier," *Experimental Dermatology*, Vol. 17, No. 12, 2008, pp. 1063-1072.
- P. V. Rao, P. F. Deng, J. Kumar, and D. L. Epstein, "Modulation of Aqueous Humor Outflow Facility by the Rho Kinase-Specific Inhibitor Y-27632," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 42, No. 5, 2001, pp. 1029-1037.
- K. Raymond, M. A. Deugnier, M. M. Faraldo, and M. A. Glukhova, "Adhesion within the Stem Cell Niches," *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 21, No. 5, 2009, pp. 623-629.
- M. Rendl, J. Ban, P. Mrass, C. Mayer, B. Lengauer, L. Eckhart, W. Declercq, and E. Tschachler, "Caspase-14 Expression by Epidermal Keratinocytes is Regulated by Retinoids in a Differentiation-Associated Manner," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 119, No. 5, 2002, pp. 1150-1155.

- A. S. Ribeiro, A. Albergaria, B. Sousa, A. L. Correia, M. Bracke, R. Seruca, F. C. Schmitt, and J. Paredes, "Extracellular Cleavage and Shedding of P-Cadherin: a Mechanism Underlying the Invasive Behaviour of Breast Cancer Cells," *Oncogene*, Vol. 29, No. 3, 2010, pp. 392-402.
- A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz, "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back," *Science*, Vol. 302, No. 5651, 2003, pp. 1704-1709.
- J. D. Rotty and P. A. Coulombe, "A Wound-Induced Keratin Inhibits Src Activity during Keratinocyte Migration and Tissue Repair," *The Journal Cell Biology*, Vol. 197, No. 3, 2012, pp. 381-389.
- E. E. Sander, J. P. ten Klooster, S. van Delft, R. A. van der Kammen, and J. G. Collard, "Rac Downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between Both GTPases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior," *The Journal Cell Biology*, Vol. 147, No. 5, 1999, pp. 1009-1022.
- G. Schaumburg-Lever, "Ultrastructural Localization of Lectin-Binding Sites in Normal Skin," *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 94, No. 4, 1990, pp. 465-470.
- A. M. Shewan, M. Maddugoda, A. Kraemer, S. J. Stehbens, S. Verma, E. M. Kovacs, and A. S. Yap, "Myosin 2 is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell-Cell Contacts," *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 16, No. 10, 2005, pp. 4531-42.
- Y. Shimoyama, S. Hirohashi, S. Hirano, M. Noguchi, Y. Shimosato, M. Takeichi, and O. Abe, "Cadherin Cell-Adhesion Molecules in Human Epithelial Tissues and Carcinomas," *Cancer Research*, Vol. 49, No. 8, 1989, pp. 2128-2133.
- H. Tseng and H. Green, "Association of Basaloid with Ability of Keratinocytes to Multiply and with Absence of Terminal Differentiation," *The Journal Cell Biology*, Vol. 126, No. 2, 1994, pp. 495-506.
- A. L. Tyner, and E. Fuchs, "Evidence for Posttranscriptional Regulation of the Keratins Expressed during Hyperproliferation and Malignant Transformation in Human Epidermis," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 103, No. 5, 1986, pp. 1945-1955.
- K. S. Uchida, T. Kitanishi-Yumura, and S. Yumura, "Myosin II Contributes to the Posterior Contraction and the Anterior Extension during the Retraction Phase

- in Migrating Dictyostelium Cells,” *Journal of Cell Science*, Vol. 116, No. Pt 1, 2003, pp. 51-60.
- L. Van Aelst and M. Symons, “Role of Rho Family GTPases in Epithelial Morphogenesis,” *Genes & Development*, Vol. 16, No. 9, 2002, pp.1032-1054.
- M. Van de Craen, G. Van Loo, S. Pype, W. Van Criekinge, I. Van den brande, F. Molemans, W. Fiers, W. Declercq, and P. Vandenabeele, “Identification of a New Caspase Homologue: Caspase-14,” *Cell Death and Differentiation*, Vol. 5, No. 10, 1998, pp. 838-846.
- R. A. Worthyake and K. Brridge, “RhoA and ROCK Promote Migration by Limiting Membrane Protrusions,” *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 15, 2003, pp. 13578-13584.
- R. A. Weiss, R. Eichner, and T. T. Sun, “Monoclonal Antibody Analysis of Keratin Expression in Epidermal Diseases: a 48- and 56-k Dalton Keratin as Molecular Markers for Hyperproliferative Keratinocytes,” *The Journal of Cell Biology*, Vol. 98, 1984, pp.1397-1405.

和文摘要

創傷治癒過程における再上皮化は、生物が生きていくために必要不可欠な能力である。再上皮化過程には創部及び創周囲では多くの性質が異なる細胞や組織が動員され、それぞれが複雑に絡み合いながら作用すること、そして創傷治癒の様式は個体発生の段階によって異なることが知られている。しかし、その仕組みには未だ解明されていない部分が多く、特に表皮に注目した *in vivo* 実験系の研究は少ない。そこで、本研究では、再上皮化過程における表皮の再生のメカニズムを形態学的に解析した。

まず、生後 1 日齢ラット新生児の背部皮膚に全層切創を施し、創周囲皮膚切片のヘマトキシリンエオシン染色および上皮特異的中間径線維であるケラチン抗体染色を行った。その結果、創縁の表皮がシートの状態を保ったまま這い出し、傷つけ後 48 時間までに創部を被覆した。その後、創を塞いだ表皮は一度真皮の方向へ肥厚し始め、傷つけ後 96 時間辺りで最も厚くなり、やがて薄化するという過程を経て、傷つけ後 192 時間までには正常な厚さに回復した。創閉鎖後の創傷治癒の収束過程については殆ど研究されていないことから、著者は創閉鎖後に創部表皮の厚さが変動する現象に着目し、その原因の究明を試みた。

創部を被覆した表皮の厚さが最大に達した時、創部表皮では生細胞数が増加していたことから、まず、創部の表皮において細胞増殖とアポトーシスについて解析した。すると、TUNEL 陽性細胞の割合の変化から、肥厚した表皮が薄化しつつある傷つけ後 120 時間の顆粒層辺りでアポトーシスの増加が確認された。続いて、表皮ケラチノサイトの分化マーカーである *loricrin*, *involucrin*, *filaggrin* に対する免疫組織染色を行ったところ、傷つけ後 96 時間から 120 時間の肥厚した創部表皮では、ケラチノサイトの終末分化が遅延、あるいは分化速度が変動していることが示唆された。さらに、創部表皮が肥厚している傷つけ後 96 時間では、表皮ケラチノサイトの終末分化の後期過程で働く *caspase-14* の発現もごく一部に限定されていた。しかし表皮が薄化し始めた傷つけ後 120 時間になると、*caspase-14* 陽性細胞は表皮下層まで拡大し、発現も増加した。以上の結果から、新生児ラットの創部表皮の厚さが変動するのは、傷つけ後に表皮ケラチノサイトの終末分化すなわち角質化が一度遅延し、その後一転して加速するためであると結論づけた。

続いて、著者は創閉鎖過程における表皮の挙動を、真皮の影響を排除して解析するために、真皮の損傷をできる限り小さく抑えた“微小創”を施した。全層切創と異なり、

微小創では表皮全層と真皮の上部 3 分の 1 程度のみが切断され、それ以下の皮膚は正常なまま残されるため、より単純化された表皮創閉鎖の実験系になると期待された。ラット新生児皮膚にこの微小創をつけ、細胞の移動に関与するアクチン細胞骨格系や、カドヘリン、ケラチン等に着目して、創縁表皮の動きや形態変化との関連について経時的に解析した。

その結果、微小創では、創部表皮の移動によって傷つけ後 12 時間までに創閉鎖が完了した。その際、創部中央に向かって移動する創縁表皮では P-カドヘリンの発現パターンに変化がみられたほか、正常な皮膚では検出されない K6 ケラチンや活性型のミオシン (p-MLC) が確認された。一方、創部の真皮では、傷つけ後 18 時間でもまだ創の間隙が残されたままであり、表皮と比較して修復が遅れた。また、ミオシンのリン酸化に関与する Rho-associated protein kinase (ROCK) を、阻害剤を用いて創部で局所的に阻害したところ、傷つけ後 12 時間では創閉鎖が完了せず、創縁表皮における p-MLC は検出されなかった。同様に、ミオシンのリン酸化と拮抗する経路に関与する Rac 1 を阻害した場合も、創閉鎖は傷つけ後 12 時間ではみられなかった。しかし、ROCK 阻害の場合と多少異なり、傷つけ後 8 時間では p-MLC が観察され、傷つけ後 12 時間になると消失していた。創閉鎖も 12 時間ではおこななかった。以上の結果から、ラット新生児皮膚の創閉鎖は、主に Rac 1 や Rho A に依存したアクチン細胞骨格系を介した表皮の能動的な運動によって遂行され、この過程には真皮は関与しない可能性が示唆された。

しかし、微小創を成体ラットに施すと傷つけ後 18 時間でも創閉鎖には至らなかったことから、成体と比べて真皮の物理的な影響が小さい新生児皮膚は、創閉鎖過程における表皮の挙動を解析するのに有利であると考えられる。上皮治癒様式は個体発生段階によって異なることが知られているが、本研究もこれを支持する結果といえる。

過去の多くの研究から、皮膚創傷治癒は、多様な細胞や組織が参加する複雑な過程であるといわれている。しかし、その内の表皮創閉鎖過程は、純粹に表皮のみによる、Rho スモール GTPases を介したアクチン細胞骨格による能動的な移動だけで説明ができるかもしれない。そして表皮創閉鎖後にも、真皮の再構成は継続し、この間に表皮は終末分化のタイミング等を変動させることによって厚さを変える。本研究は、受創に対する表皮の動態を *in vivo* 実験系を用いて明らかにし、表皮の持つ組織修復機能の一端を明らかにしたものと見える。

英文摘要

Reepithelialization, a part of the process of the wound healing, is essential for organisms to survive. However, many parts of the mechanisms involved in the reepithelialization process still remain to be elucidated, because this kind of study encounters many difficulties due to the complexity of the experimental system, such as multiplicity of participants therein and the influences of type and geometry of wounds, and so on. In particular, few studies have examined *in vivo* studies focused on the epidermis, and therefore the author investigated the mechanism of regeneration of epidermis during the reepithelialization morphologically.

The results from hematoxylin-eosin (HE) staining or anti-keratins immunohistochemistry showed that the full-thickness incisional wounds on neonatal rats skin were closed by the epidermal sheets that crawled from the wound edge and contacted with each other at the wound center by 48 h post-wounding (PW). Thereafter, the epidermis covering the wound tended to thicken downward the dermis once, and restored the normal thickness. So far, the analyses of the epidermis at the post-wound-closure stage were infrequently made. Thus, the author first examined how and why the epidermal thickness fluctuated during the wound healing process, especially after wound closure, in the same *in vivo* system as above.

The thickness of the epidermis peaked around 96 h PW, and then became thinner. The living cells in this thickened epidermis outnumbered those in the control epidermis, as long as the total numbers of DAPI-positive nuclei were compared. Then, the author analyzed cell proliferation and apoptosis at the wounded epidermis. The data on the fluctuation of the rate of the TUNEL-positive cells showed that apoptosis increased in the upper layers in the thinning thickened-epidermis around 120 h PW. Immunostaining was also conducted using the specific antibodies against the epidermal differentiation markers, such as loricrin, involucrin, and filaggrin. The results suggested that the delay or interruption of the spinous to granular

transition might result in the epidermal thickening in the wound region. Furthermore, the region undyed with anti-caspase-14 antibody extended downward in the thickened epidermis by 96 h PW, and in turn, became intensely and widely stained with this antibody in the thinning epidermis by 120 h PW. Taken together, it is likely that the delay and acceleration of the terminal differentiation, including cornification, of the epidermal keratinocytes may coordinately cause the fluctuation of the thickness of the epidermis at the wound site in rat neonates.

Next, the intrinsic roles and behaviors of epidermis itself during wound closure on neonatal rat skin were explored by developing and utilizing a novel *in vivo* wound model, termed “shallow incisional wound” in which the injury of dermis was minimized. The shallow incisional wounds made on neonatal rat skin were immunohistochemically analyzed by use of antibodies to actomyosin cytoskeleton, cadherins, and keratin.

The shallow wounds were closed by 12 h PW by the migration of the wound-marginal epidermal sheets in which activated myosin light chain (p-MLC) was predominantly stained at the lateral plasma membrane. The wound-specific expression of keratin 6 and the overexpression of P-cadherin were also observed in the migrating epidermal areas. On the other hand, at the dermis beneath the wounds, small gaps were left in many sections from 6 h PW onward, even after wound closure by epidermis. By local administration of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y27632, p-MLC disappeared at the wound margin and the wounds were not closed until 12 h PW. Inhibition of Rac 1 by NSC23766 also resulted in an arrest of wound closure until 12 h PW, though NSC23766 somewhat slowly acted on p-MLC expression. These results suggest that, without joining of dermis, epidermis has a potential ability of closing wounds by active epithelial sheet movement integrated by small GTPases-dependent expression and contraction of the individual cell bodies.

Also in adults, the shallow incisional wounds did not close until 18 h PW. This may be due to the extension of the wounds by tension of well-developed collagen fibers in dermis. The neonatal skin would be beneficial for the analysis of the pure movement of epidermis in wound closure, since neonatal

skin is thought to be less physically influenced by dermis than adult skin. The results obtained in this study are generally consistent with the previous findings that the patterns of epithelial wound healing change with developmental stages, and that the wound closure in neonates and fetus is faster than that in adults.

This study on the wound healing in rat neonates could provide morphological evidence that small GTPases-mediated actomyosin is essential for the epidermal wound closure *in vivo*, a potential ability of epidermis. After wound closure, the epidermis in the wound areas dramatically fluctuate its thickness. The author proposes that one mechanism therein may be the regulation of some steps involved in its terminal differentiation.

学位論文の基礎となる公表論文

M. Arai, T. Matsuzaki, and S. Ihara (2013)

Wound Closure on the Neonatal Rat Skin I. The Modulation of the Thickness of Epidermis at the Closing Incisional Wounds.

CellBio, Vol. 2, No. 4, pp. 248-256. 【第二章】

M. Arai, T. Matsuzaki, and S. Ihara (2013)

Wound Closure on the Neonatal Rat Skin II. The Potential Ability of Epidermis to Close Small-Sized Wounds Independently of the Underlying Dermis.

CellBio, Vol. 2, No. 4, pp. 257-266. 【第三章】